

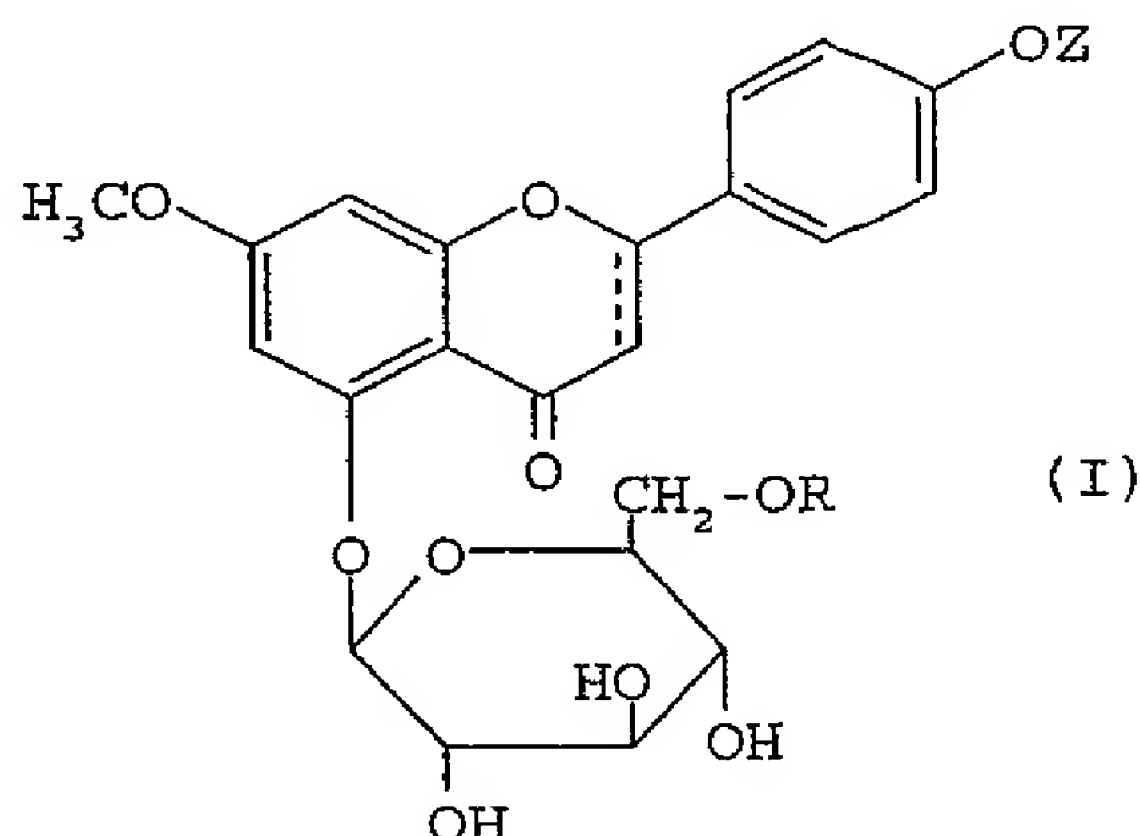
**DERIVES DE GENKWANINE ET SAKURANETINE, UTILISATION  
COSMETIQUE ET THERAPEUTIQUE, ET PROCEDE DE  
PREPARATION**

5

**Domaine de l'invention**

La présente invention a trait à des dérivés osylés de genkwanine et sakuranétine. Plus précisément, elle concerne (i) l'utilisation en cosmétique ou dermatologie, d'une part, et en thérapeutique, d'autre part, des dérivés  
10 osylés de genkwanine et sakuranétine de formule I ci-après, (ii) des nouveaux dérivés de formule I en tant que produits industriels, et (iii) leur procédé de fabrication.

Les composés selon l'invention répondent à la formule I :

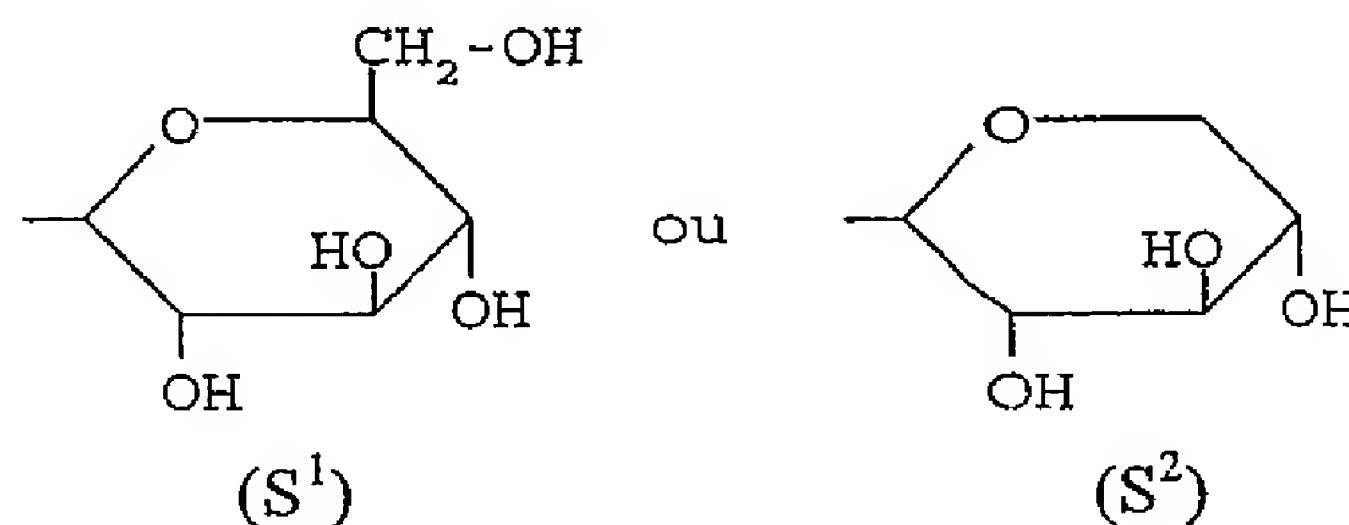


15

dans laquelle,

le symbole  $\equiv$  représente une simple ou une double liaison,

R représente H ou un reste osyle, notamment de structure S<sup>1</sup> ou S<sup>2</sup> :



20

Z représente H, un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, acyle en C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, ose ou sulfate.

### Art antérieur

On sait que quelques produits de formule I ont déjà été décrits et étudiés dans le passé. En particulier la 5-O- $\beta$ -D-primevérosyl-genkwanine (qui est un composé de formule I où le symbole  $\equiv$  représente une double  
5 liaison, R est un reste osyle de structure  $S^2$ , et Z est H) est obtenue par extraction de *Gnidia kraussiana* (une plante de la savane africaine de la famille des thyméléacées) et possède des propriétés immunitaires (notamment immunostimulantes), anticancéreuses et antileucémiques. Plus précisément, lors de désordres immunitaires graves, les lymphoblastes  
10 physiologiques sont en hyperplasie, et l'intérêt de la 5-O- $\beta$ -D-primevérosyl-genkwanine réside dans le fait qu'elle détruit les lymphoblastes formés. Voir à cet effet FR 2510580 A, FR 2597751 A et l'article de Jer-Huei LIN *et al.*, *Yaowu Shipin Fenxi*, 2001;9(1),6-11.

Le pinostrobin-5-glucoside (qui est un composé de formule I où le  
15 symbole  $\equiv$  représente une double liaison, R est H, et Z est H) a été isolé de l'écorce de *Prunus cerasus* et est considéré comme étant caractéristique de l'espèce *Prunus cerasus*. Voir à cet effet l'article de Martin GEIBEL *et al.*, *Phytochemistry*, 1991;30(5),1519-1521.

La sakuranine, autre nomenclature : sakuranétine-5-glucoside, (qui  
20 est un composé de formule I où le symbole  $\equiv$  représente une simple liaison, R est H, et Z est H), a été isolée de *Prunus yedoensis* sans que ses éventuelles propriétés cosmétiques ou pharmacologiques (notamment les propriétés antiradicalaires) aient été étudiées. Voir à cet effet l'ouvrage *Merck Index, 12th Edition, 1996, Monograph No. 8470, pages 1431-1432*.

25 L'art antérieur précité ne décrit ni ne suggère que les composés de formule I selon l'invention présentent des propriétés bénéfiques :

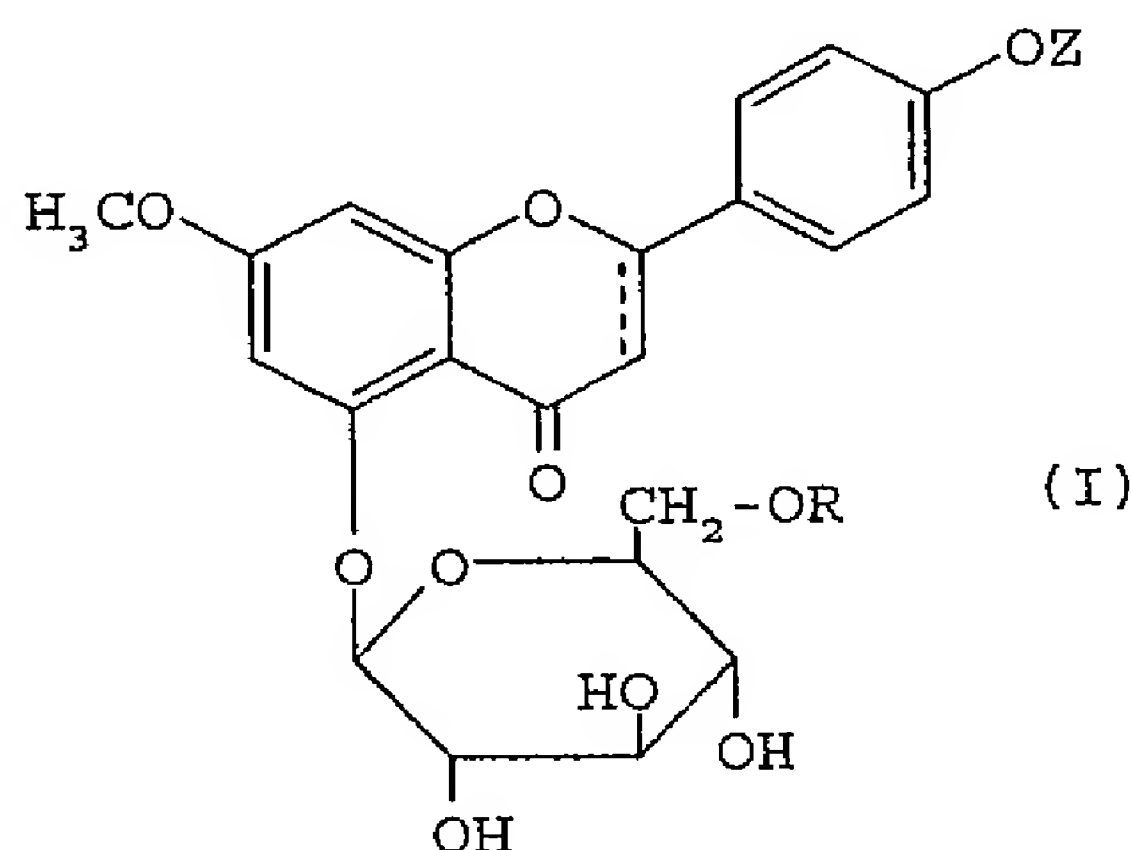
- en cosmétique ou dermatopharmacie, en tant que substances améliorant la texture de la peau, et
- en thérapeutique humaine ou vétérinaire (notamment les animaux à  
30 sang chaud), en tant que substances antiradicalaires.

### Objet de l'invention

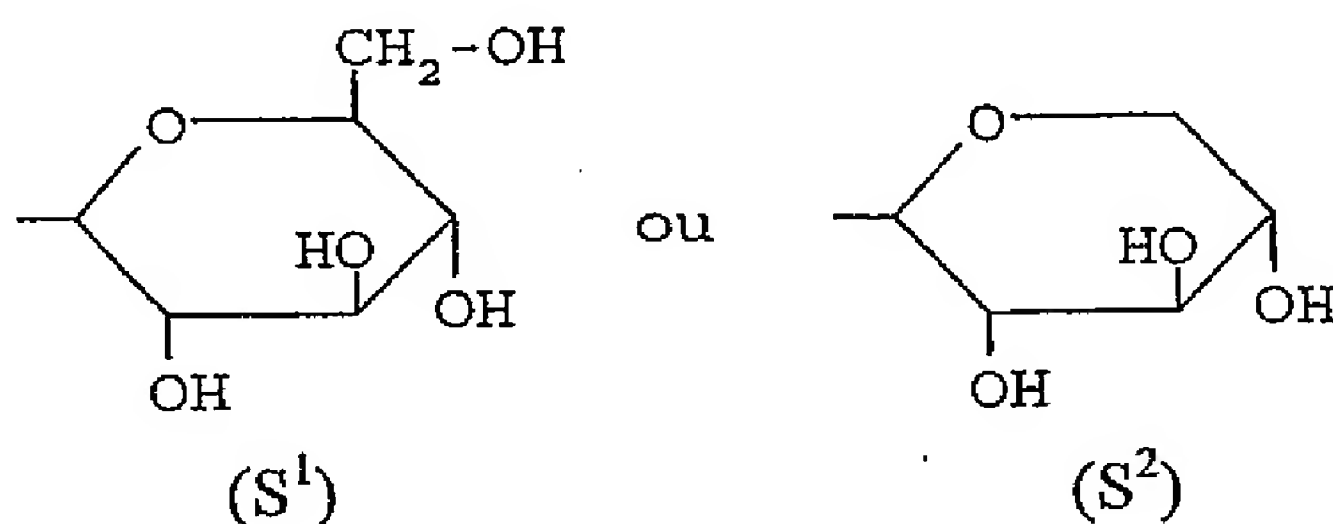
Selon un premier aspect de l'invention, on préconise une nouvelle utilisation de dérivés osylés de genkwanine et sakuranétine, en tant que substances (a) cosmétiques ou dermatologiques, ou (b) antiradicalaires,

pour (a) améliorer la texture de la peau ou, respectivement, (b) traiter ou prévenir les désordres provoqués par les radicaux libres.

Dans cette optique, on fournit une nouvelle utilisation (a) en cosmétique ou dermatologie, d'une part, ou (b) en thérapeutique humaine ou vétérinaire, d'autre part, ladite utilisation étant caractérisée en ce que  
 5 l'on fait appel à une substance choisie parmi l'ensemble constitué par  
 (i) les dérivés osylés de genkwanine ou sakuranétine de formule I :



10 dans laquelle,  
 le symbole  $\equiv$  représente une simple ou une double liaison,  
 R représente H ou un reste osyle, notamment de structure S<sup>1</sup> ou S<sup>2</sup> :



15

Z représente H, un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, acyle en C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, ose ou sulfate, et

(ii) leurs mélanges,  
 20 en tant qu'ingrédient actif (a) cosmétique ou dermatologique, ou, respectivement, (b) antiradicalaire, pour l'obtention (a) d'une préparation cosmétique ou dermatologique pour améliorer la texture de la peau ou,

respectivement (b) d'un médicament destiné à un usage en thérapeutique vis-à-vis des désordres provoqués par les radicaux libres.

Selon un second aspect de l'invention, on préconise, en tant que produits industriels nouveaux, des composés de formule I où R est  
5 notamment un reste ose de structure S<sup>1</sup> et leurs mélanges.

Selon un troisième aspect de l'invention, on préconise un procédé pour la préparation des composés de formule I et en particulier pour celle desdits nouveaux composés.

### *Brève description des dessins*

10 Les figures annexées concernent une partie des résultats des essais qui ont été entrepris avec des produits de formule I :

- la figure 1 montre que les produits de formule I testés ont des propriétés antiradicalaires, et
- les figures 2 et 3 montrent que les produits de formule I testés  
15 présentent un intérêt en tant qu'agents immunosuppresseurs.

### *Description détaillée de l'invention*

La présente invention englobe des dérivés osylés de genkwanine quand le symbole  $\equiv$  représente une double liaison, d'une part, et des dérivés osylés de sakuranétine quand ledit symbole  $\equiv$  représente une  
20 simple liaison, d'autre part.

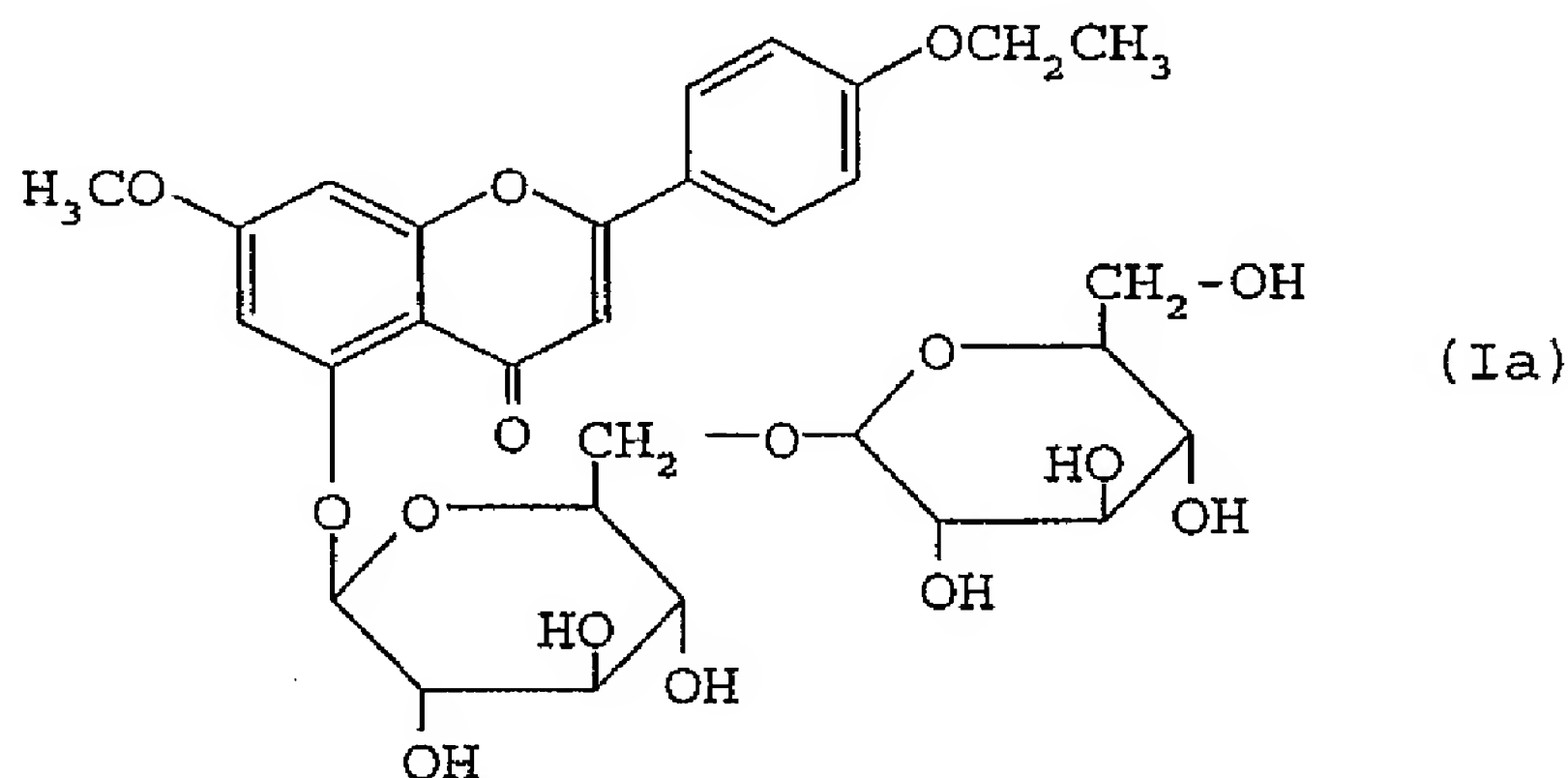
Dans la définition de Z, les groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> comprennent des groupes à chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, à savoir les groupes méthyle, éthyle, n-propyle, i-propyle, n-butyle, sec.-butyle et tert.-butyle ; les groupes acyle en C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> comprennent les groupes aliphatiques à chaîne  
25 hydrocarbonée linéaire ou ramifiée ayant de 1 à 5 atomes de carbone, à savoir les groupes CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCO, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>CO, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CO et (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CCO ; le groupe sulfate comprend le reste SO<sub>3</sub><sup>-</sup> que l'on rencontre principalement sous la forme acide SO<sub>3</sub>H et, le cas échéant, sous une forme  
30 salifiée telle que SO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> ou SO<sub>3</sub>Na. Enfin le groupe Z peut représenter un reste osyle, notamment un reste glucosyle, xylosyle, thioxylosyle, fructosyle, mannosyle, etc.

Le groupe osyle, qui intervient dans la définition de R, peut être un reste ose quelconque, notamment un des restes énumérés plus haut pour le

groupe pour Z. Avantageusement, les groupes R selon l'invention seront de structure  $S^1$  ou  $S^2$ , la structure  $S^1$  étant la préférée.

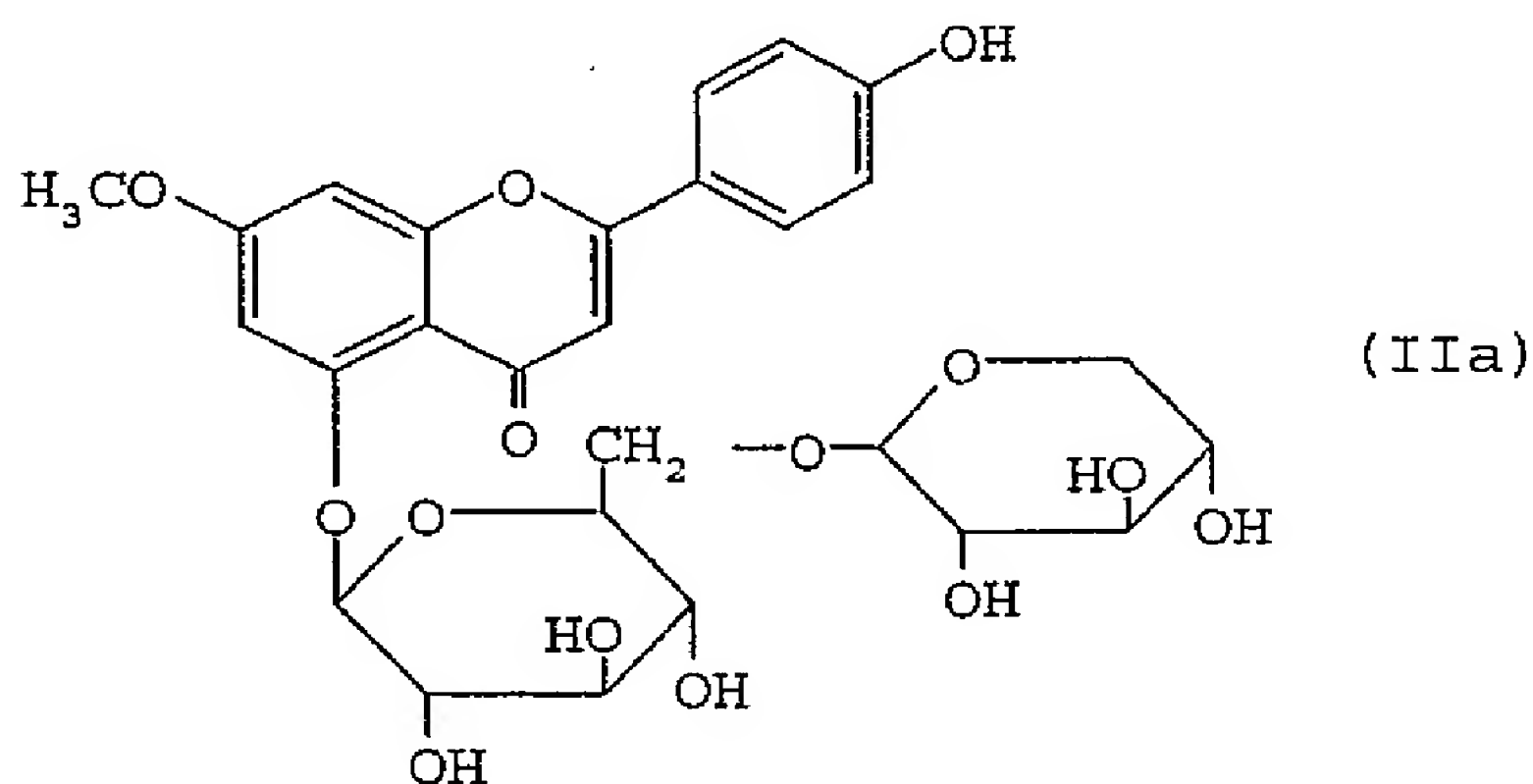
Parmi les composés de formule I conformes à l'invention, l'on peut avantageusement citer :

- 5 • Ia 5-[O-6-(D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]oxy-2-(4-éthoxyphényl)-7-méthoxy-4H-1-benzopyran-4-one [autre nomenclature : 4'-éthoxy-genkwanine-5-(D-glucosido)- $\beta$ -D-glucoside] de formule Ia :

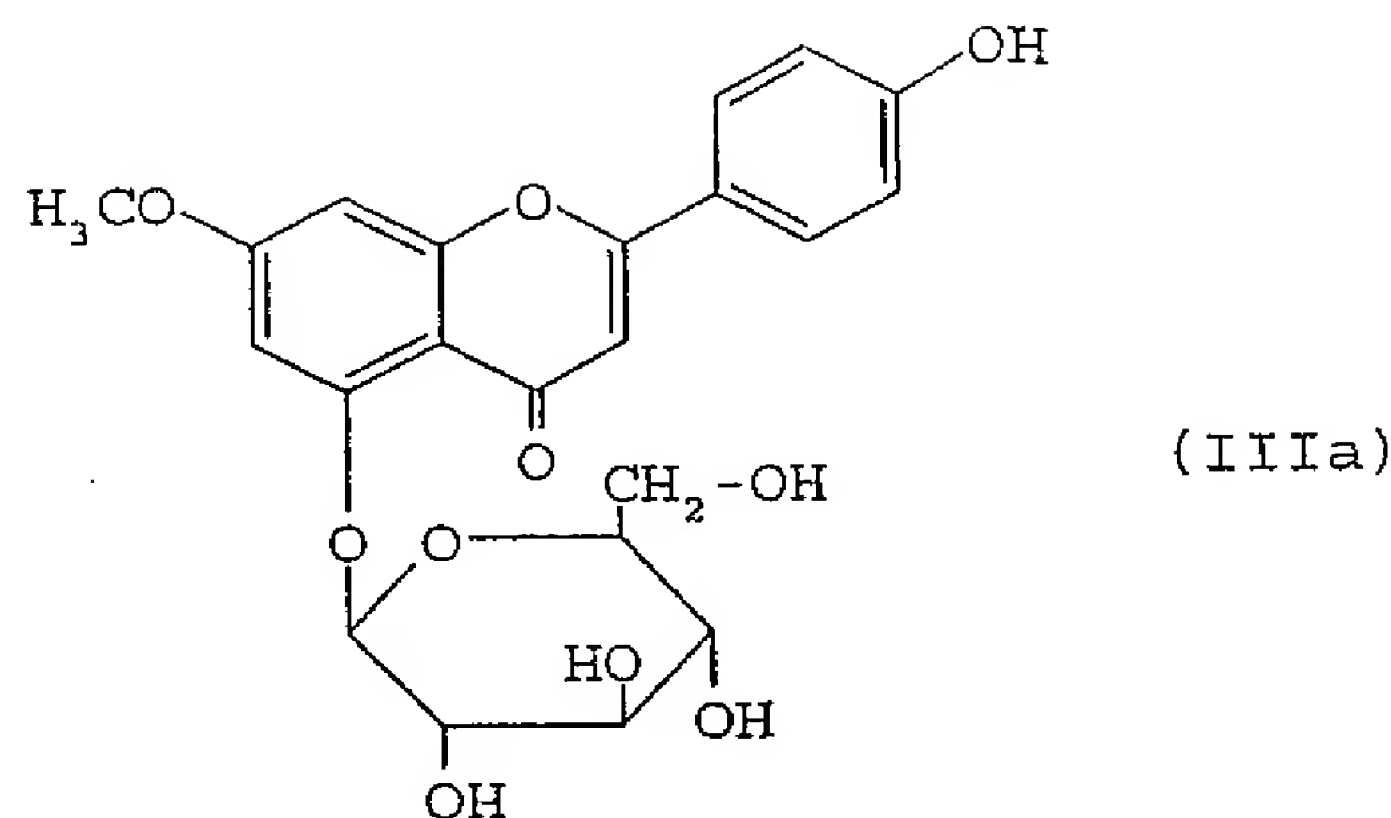


10 qui est le produit le plus intéressant de l'invention ;

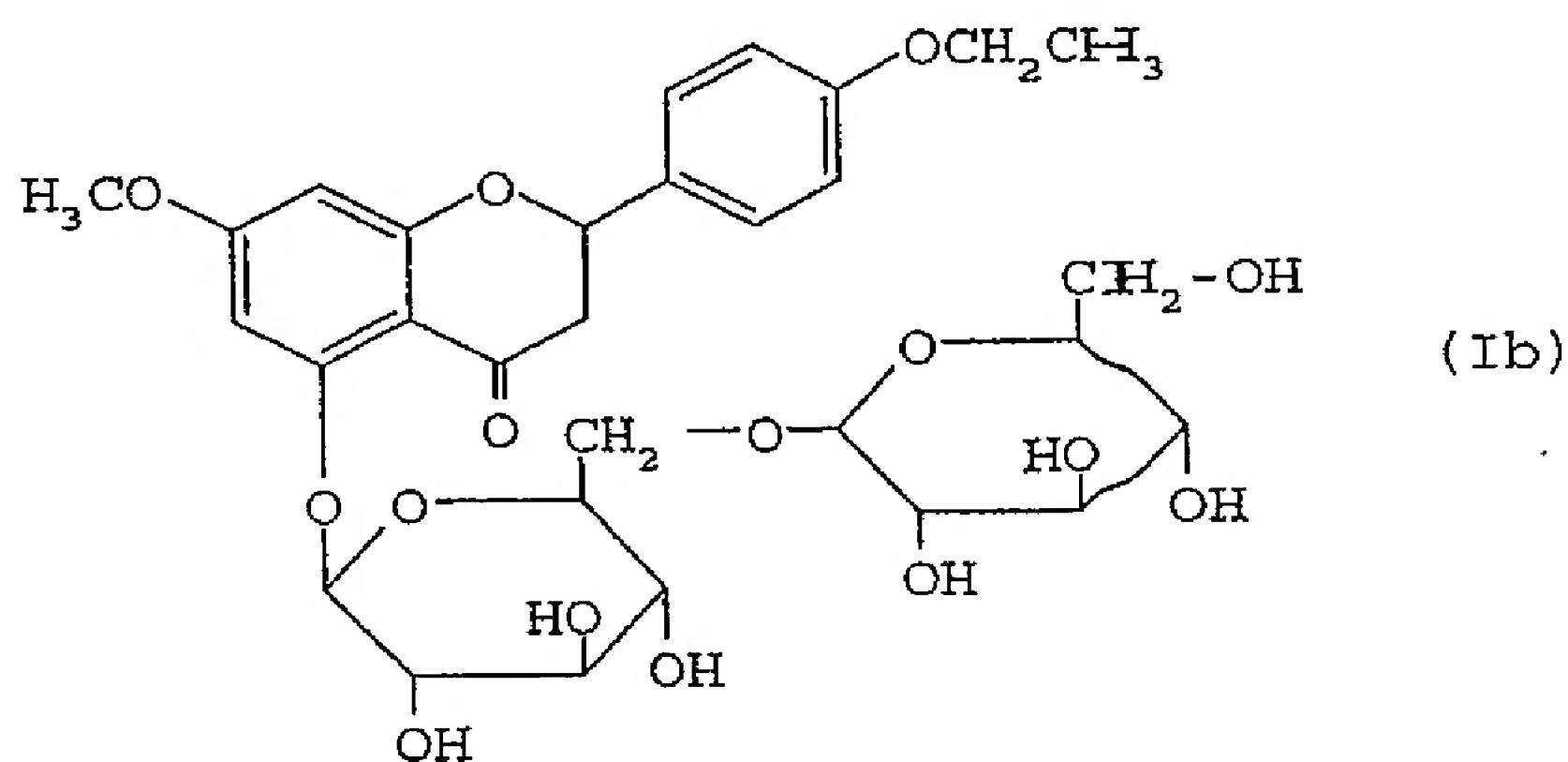
- Ia 5-O- $\beta$ -D-primevérosyl-genkwanine précitée de formule IIa :



- le pinostrobin-5-glucoside précité de formule IIIa :

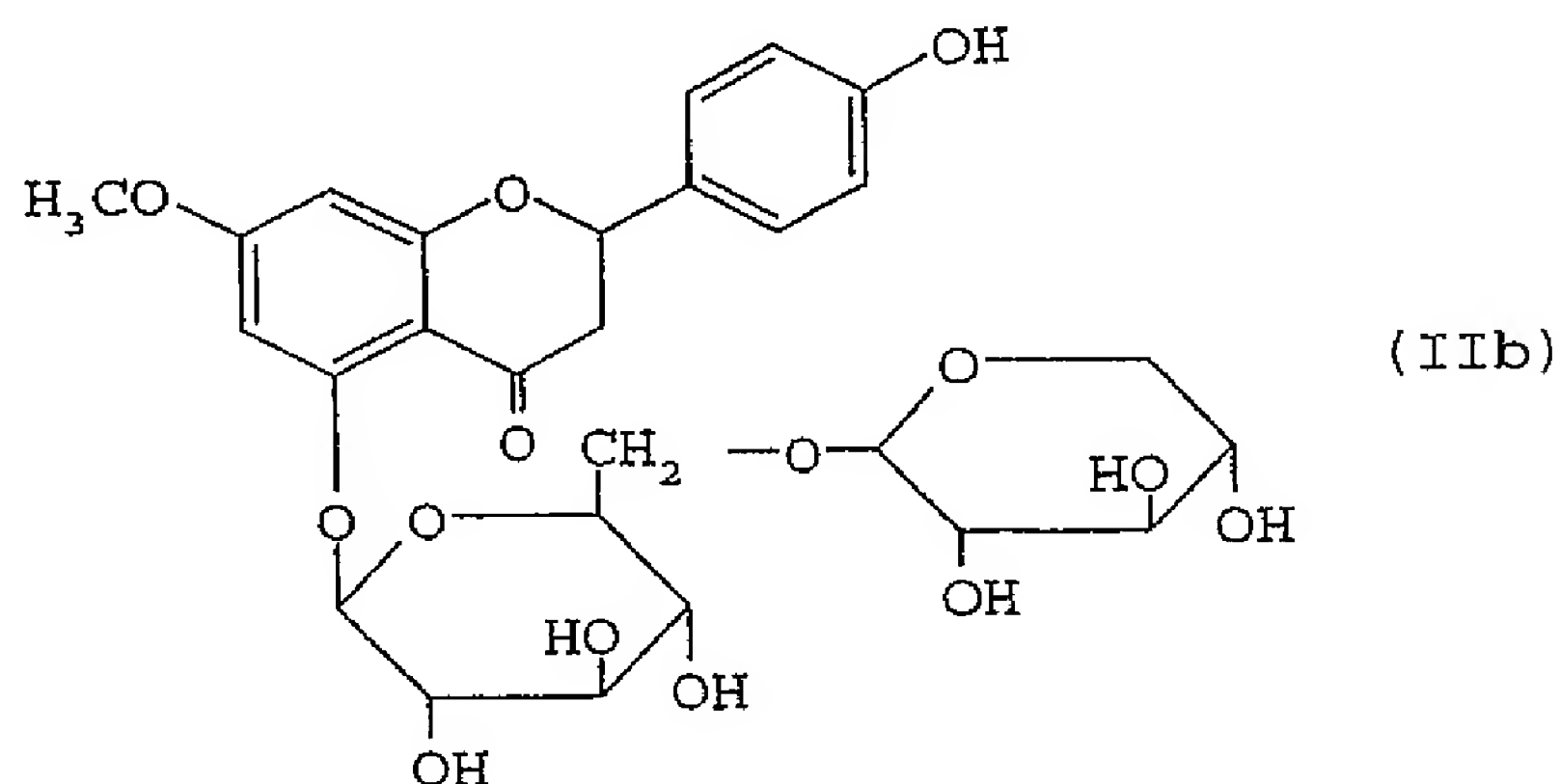


- la 2,3-dihydro-5-[O-6-(D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]oxy-2-(4-éthoxyphényl)-7-méthoxy-4H-1-benzopyran-4-one [autre nomenclature :  
 5 4'-éthoxysakuranétine-5-(D-glucosido)- $\beta$ -D-glucoside de formule Ib :



qui est l'homologue du produit de formule Ia eu égard au remplacement de la genkwanine par la sakuranétine,

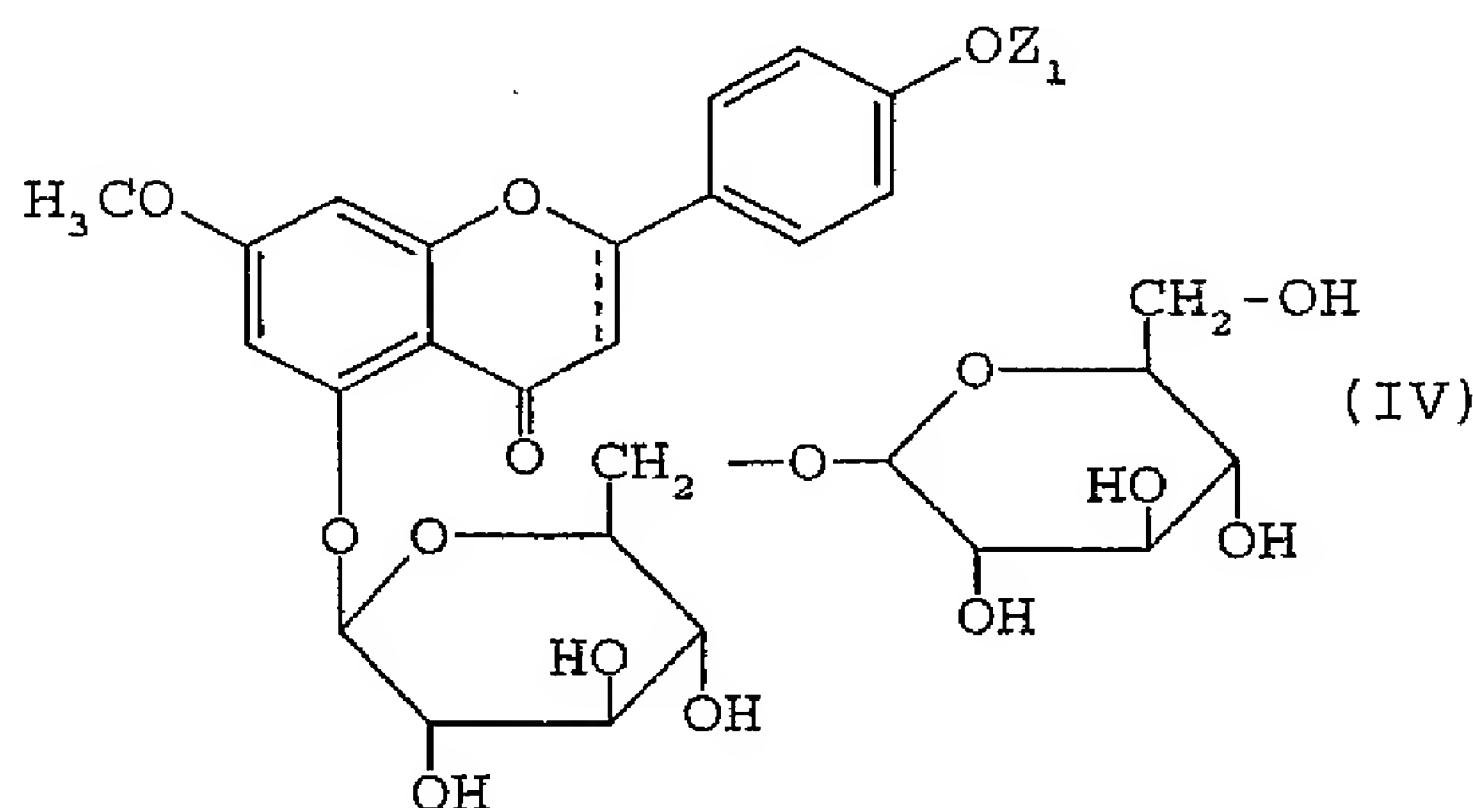
- 10 • la 5-O- $\beta$ -D-primevérosyl-sakuranétine de formule IIb :



et leurs dérivés où Z est un groupe sulfate (de préférence  $\text{SO}_3\text{H}$ , ou le cas échéant  $\text{SO}_3\text{Na}$  voire  $\text{SO}_3\text{NH}_4$ ).

Parmi les composés nouveaux selon l'invention, l'on peut citer plus particulièrement les produits de formule IV :

5



dans laquelle symbole  $\equiv$  représente une simple ou une double liaison et  $Z_1$  a la même définition que Z ci-dessus et représente avantageusement un groupe alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$  (de préférence le groupe éthyle) ou sulfate (de préférence le groupe  $\text{SO}_3\text{H}$ ).

Les composés de formule I peuvent être préparés selon une méthode connue en soi par application de mécanismes réactionnels et/ou processus d'extraction classiques. A titre d'exemple : (i) on extrait la genkwanine, la sakuranétine ou un de leurs osides à partir d'une plante appropriée appartenant à l'ensemble des *Prunus*, *Gnidia* et *Daphne* ; (ii) on osyle en position 5 l'aglycone avec un ose approprié (si nécessaire après blocage de la fonction OH en position 4' si celle-ci n'est pas protégée), et/ou (iii) on éthérifie (notamment au moyen d'un iodure d'alkyle pour ne pas affecter les groupes OH de la portion sucre), estérifie ou sulfate le groupe 4'-OH de l'oside extrait ou préparé comme indiqué ci-dessus (si nécessaire après déprotection du groupe 4'-OH).

Le procédé, que l'on recommande selon l'invention pour préparer le composé de formule Ia, est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- 25 (1°) extraire les racines broyées de *Daphne gnidium* avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,
- (2°) filtrer pour écarter la solution de chlorure de méthylène, ainsi obtenue, et recueillir le résidu solide que l'on sèche ;
- (3°) extraire ledit résidu solide sec, ainsi obtenu, avec  $\text{CH}_3\text{OH}$  ;



- (4°) filtrer pour recueillir la solution méthanolique, ainsi obtenue, et écarter le résidu solide résultant ;
- (5°) évaporer à sec la solution méthanolique, ainsi recueillie, sous vide, à une température inférieure ou égale à 60 °C, pour obtenir un résidu solide ;
- (6°) laver le résidu solide, ainsi obtenu à l'étape (5°), avec de l'eau à une température inférieure ou égale à 60 °C sous agitation, et laisser refroidir ;
- (7°) éliminer l'eau de lavage puis reprendre le résidu solide avec CH<sub>3</sub>OH ;
- (8°) reproduire 3 à 7 fois le cycle des opérations des étapes (5°) à (7°) jusqu'à ce que la dernière eau de lavage soit jaune pâle et limpide ;
- (9°) reprendre le résidu sec résultant avec un mélange méthanol-eau 25/2 p/p selon une quantité appropriée pour obtenir un liquide ayant une densité de 0,885 g/mL ;
- (10°) laisser reposer ledit liquide à 2-4 °C, de préférence à 3 °C, pendant au moins 2 jours, de préférence pendant 3 jours, et recueillir le précipité formé ;
- (11°) laver ledit précipité avec successivement du méthanol puis des mélanges méthanol-éther ayant des teneurs croissantes en éther, jusqu'à ce que le surnageant soit incolore ;
- (12°) filtrer le précipité, ainsi obtenu, et le laver plusieurs fois à l'éther, jusqu'à ce que l'éther de lavage soit incolore ;
- (13°) filtrer et sécher le produit solide résultant qui est constitué d'un mélange des produits de formules Ia, IIa et IIIa ; et,
- (14°) si nécessaire, séparer ledit mélange pour recueillir le produit de formule Ia.

De façon pratique, l'extraction de l'étape (1°) est menée à chaud (i. e. à une température de 30-35 °C sous pression atmosphérique ( $\approx 10^5$  Pa) ou, le cas échéant, à une température plus élevée sous pression réduite) pendant 3-6 jours (de préférence pendant 5 jours) dans un appareil de type Kumagawa ; l'extraction de l'étape (3°) est effectuée à chaud (notamment à une température de 45-55 °C sous pression normale ( $\approx 10^5$  Pa) ou, le cas



échéant, à une température plus élevée sous pression réduite) dans le même appareil pendant 3-6 jours (de préférence pendant 5 jours).

Eu égard aux modalités préférentielles sus-visées, on obtient à l'issue de l'étape (13°) un mélange Ia/IIa/IIIa selon un rapport pondéral d'environ  
5 10/85/5 p/p.

En fonction des purifications entreprises par chromatographie, on obtient à l'issue de l'étape (14°) :

- un mélange Ia/IIa enrichi en Ia, notamment le mélange Ia/IIa 80/20 p/p, ou
- 10 • le composé de formule Ia essentiellement pur (i. e. ayant une pureté supérieure ou égale à 98 %) ou plus purifié (i. e. ayant une pureté supérieure ou égale à 99,5 %).

Les composés de formule I, et en particulier les composés nouveaux de formule IV, sont utiles en cosmétique ou dermatopharmacie en tant  
15 qu'agents améliorant la texture de la peau.

Administrés par voie topique, sous forme d'une solution, d'une lotion, d'un gel ou d'une émulsion le cas échéant multiple (par exemple une émulsion H/L/H ou L/H/L), les composés de formule I ou IV ont :

- une action favorable sur les effets du vieillissement de la peau, notamment pour réduire les rides et assurer la fermeté et la souplesse  
20 souhaitées pour la peau ;
- un effet anti-age permettant d'éviter l'injection de collagène ; et,
- un pouvoir de contrôle de l'hydratation de la peau.

En particulier, comme les composés de formule I ou, respectivement, IV s'hydratent aisément en  $I \cdot xH_2O$  ou, respectivement,  $IV \cdot xH_2O$  (où x est  
25 un nombre entier ou fractionnaire compris notamment entre 0,3 et 5), ils servent, selon l'invention, dans l'épaisseur de la peau en tant que régulateurs d'hydratation, soit en captant l'eau en excès, soit surtout en apportant de l'eau quand la teneur en eau dans la peau est insuffisante.

30 Outre l'aspect cosmétique ou dermatologique précité, les composés de formule I ou IV sont utiles en thérapeutique humaine et vétérinaire en raison de leurs propriétés antiradicalaires pour traiter et surtout prévenir les désordres induits par les radicaux libres.

Lesdits désordres comprennent en particulier les pathologies induites  
35 par une hyperproduction ou une production non contrôlée de radicaux libres

dans l'organisme, telles que les maladies myélodégénératives, le syndrome maniaco-dépressif, et la démence sénile. Les composés de formules I ou IV sont surtout intéressants en thérapeutique humaine avant que ces pathologies ne deviennent irréversibles

5 Par ailleurs, tous les composés de formule IV, qui ont été testés en vue de leurs propriétés immunomodulatrices, antiathéromateuses et anti-cancéreuses, se sont révélés efficaces. La substance préférée selon l'invention, qui est constituée par le produit de formule Ia ou les mélanges Ia/IIa/IIIa (i. e. extrait de *Daphne gnidium*) et Ia/IIa précités, est  
10 particulièrement active vis-à-vis de certains cancers et leucémies aiguës (effet antiblastique, i. e. destruction des leucoblastes), et de la leucémie myéloïde chronique.

Selon l'invention, l'on préconise une composition cosmétique (a), dermatopharmaceutique (b) ou thérapeutique (c), qui est caractérisée en ce  
15 que :

- (a) la composition cosmétique renferme, en association avec un excipient physiologiquement acceptable par voie topique, au moins un composé de formule I ;
- (b) la composition dermatopharmaceutique renferme, en association  
20 avec un excipient physiologiquement acceptable notamment par voie topique, au moins un composé de formule I ; ou,
- (c) la composition thérapeutique renferme, en association avec un excipient physiologiquement acceptable notamment par voie orale ou injectable, au moins un composé de formule IV en tant  
25 qu'ingrédient actif immunomodulateur, notamment vis-à-vis de poussées récentes de sclérose en plaque, ou anticancéreux, notamment vis-à-vis de la leucémie myéloïde chronique.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention seront mieux compris à la lecture qui va suivre d'exemples de préparation et de résultats  
30 d'essais cosmétologiques et pharmacologiques. Bien entendu, l'ensemble de ces éléments n'est nullement limitatif mais est fourni à titre d'illustration.

### *Exemples*

Quelques composés typiques de formule I ont été consignés dans le tableau I ci-après avec des produits de comparaison (CP.1 et CP.2).

*Tableau I*  
*Composés typiques selon l'invention*

| Exemple | Structure                           |
|---------|-------------------------------------|
| Ex. 1   | mélange Ia/IIa/IIIa 10/85/5 p/p     |
| Ex. 2   | produit de formule IIa              |
| Ex. 3   | produit de formule IIIa             |
| Ex. 4   | mélange Ia/IIa 80/20 p/p            |
| Ex. 5   | produit de formule Ib               |
| Ex. 6   | produit de formule IIb              |
| Ex. 7   | 4'-sulfate du produit de formule Ib |
| Ex. 8   | Produit de formule Ia               |
| Ex. 9   | 4'-sulfate du produit de formule Ia |
| Ex. 10  | mélange Ib/IIa/IIIa 10/85/5 p/p     |
| CP.1    | genkwanine                          |
| CP.2    | sakuranétine                        |

### 5 Préparation A

- Obtention du mélange Ia/IIa/IIIa 10/85/5 p/p (Ex. 1) -

11 kg de racines de *Daphne gnidium* (plante du bassin méditerranéen de la famille des thyméléacées) sont broyées puis traités en continu avec du chlorure de méthylène, à 30-35 °C, pendant 5 jours dans un  
 10 appareil de type Kumagawa. La solution liquide ainsi obtenue est écartée et on recueille le résidu solide que l'on sèche. On extrait ledit résidu, ainsi séché, avec du méthanol à chaud ( 45-55 °C) pendant 5 jours dans ledit  
 15 appareil de type Kumagawa. L'extrait méthanolique, obtenu après avoir écarté le résidu solide, est traité de la façon suivante : évaporation à sec sous pression réduite à une température inférieure à 60 °C dans un ballon ;  
 lavage du résidu solide, ainsi obtenu, à l'eau chaude en agitant de façon à décoller ledit résidu du fond du ballon ; refroidissement à la température  
 ambiante et élimination de l'eau de lavage ; et reprise du résidu dans du méthanol. Cette succession de traitements est reproduite de 5 à 7 fois, selon  
 20 l'origine des racines, jusqu'à ce que la dernière eau de lavage soit limpide et de couleur jaune pâle. Le résidu résultant est repris à chaud (45-55 °C) avec du méthanol contenant 8 % en poids d'eau, en quantité suffisante pour

obtenir un liquide ayant une densité de 0,885 g/mL. On laisse reposer pendant 3 jours à 3 °C puis récupère le précipité formé par centrifugation. On lave ce précipité par fractions successives de méthanol puis de mélanges méthanol/diméthyl éther (ou méthanol/diéthyl éther) de plus en plus riches en éther. Quand le surnageant est enfin presque incolore, on filtre le précipité et le lave plusieurs fois à l'éther jusqu'à ce que l'éther de lavage soit incolore. On obtient un solide beige très clair que l'on sèche sous pression réduite puis qui est broyé.

Ce solide est un mélange Ia/IIa/IIIa dans un rapport pondéral de 10/85/5. Le rendement est de l'ordre de 2 à 3 % selon l'origine de la plante et la saison de la récolte des racines.

### Analyse

Les composés de formules Ia, IIa et IIIa étant de structures proches (partie favonoïde et partie saccharidique) ont de fortes similarités spectroscopiques, en particulier en ultra-violet et en infra-rouge.

*Spectre UV* (dans mélange acétonitrile-eau 80/20 v/v)

On observe deux bandes d'absorption à 331,7 et 261,7 nanomètres (la bande à 261,7 nm ayant une intensité qui est d'environ la moitié de celle de la bande à 331,7 nm).

*Spectres IR* (en pastille de KBr)

On observe les bandes suivantes :

- bande intense à 3374  $\text{cm}^{-1}$  (O-H de la partie sucre) ;
- bande intense à 1635  $\text{cm}^{-1}$  (bande de vibration du carbonyle de la flavone) ;
- bande d'intensité moyenne à 1609  $\text{cm}^{-1}$  (bande de vibration de la double liaison éthylénique de la flavone) ; et
- bandes d'intensité moyenne à 1450 et 1360  $\text{cm}^{-1}$  (bandes de vibration des parties aromatiques).

### *Préparation B*

- Obtention du mélange Ia/IIa 80/20 p/p (Ex. 4) -

En soumettant le produit de l'exemple 1 à une chromatographie séparative (HPLC), on obtient le mélange Ia/IIa 80/20 p/p.

### *Préparation C*

- Obtention du produit de formule Ia (Ex. 8) -

En soumettant le produit de l'exemple 1 ou de l'exemple 4 à une chromatographie séparative plus poussée, on obtient le composé de formule Ia avec une pureté supérieure ou égale à 98 %, voire même avec une pureté supérieure ou égale à 99,5 %.

## 5 Analyse

On a déterminé les spectre de RMN (à 250 Mhz en solution dans du méthanol deutéré) et spectre de masse (par technique FAB). Les résultats obtenus sont les suivants, où la 1<sup>ère</sup> unité sucre est celle qui est liée au squelette flavone et la 2<sup>ème</sup> unité sucre est celle de structure S<sup>1</sup> ou S<sup>2</sup>.

### 10 *Spectre RMN*

- triplet centré à 1,31 ppm (groupe méthyle CH<sub>3</sub> de la chaîne phénolique alkylée),
- quadruplet centré à 3,20 ppm (groupe méthylène CH<sub>2</sub> de ladite chaîne alkylée);
- 15 - massif de 3,27 à 4,39 ppm (protons des deux unités sucre) [attributions détaillées sur la base d'expériences COSY, HMQC et HMBC à 600 Mhz, dont les deux protons anomères des deux unités sucre, respectivement à 4,75 ppm (doublet) pour la 1<sup>ère</sup> unité liée en position 5 à la flavone, et à 4,27 ppm (doublet) pour la 2<sup>ème</sup> unité;
- 20 - pont -CH<sub>2</sub>-O- entre les deux unités sucre à 3,60 (d) et 3,93 (d) ppm; et -CH<sub>2</sub>- en 5 sur 2<sup>ème</sup> unité sucre à 3,32 (d) et 3,60 (d) ppm; la stéréochimie dans les deux unités sucre ayant été établie sur la base des couplages proton-proton vicinaux en partant des protons anomères];
- 25 - 3,87 ppm (CH<sub>3</sub> du groupement CH<sub>3</sub>-O-);
- 6,60 ppm (proton éthylénique de la partie flavone);
- massif 6,91-6,94 ppm (4 protons aromatiques); et
- massif 7,82-7,86 ppm (2 protons aromatiques).

### *Spectre de masse*

30 Masse moléculaire : 636,598 (C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>)

Pic de masse : 636; adduits de Na et K conformes.

La méthode de spectrométrie de masse a été également utilisée pour confirmer les structures de formules Ia, IIa et IIIa après acétylation de tous les groupements O-H (par le mélange anhydride acétique/pyridine); il a été  
35 procédé à l'analyse par spectrométrie de masse des produits d'acétylation



après purification chromatographique sur silice (éluant : eau/acétonitrile 50/50 v/v).

### *Préparation C bis*

- Obtention des produits de formule IIa (Ex. 2) et de formule IIIa (Ex. 3) -

5 En soumettant le produit de l'exemple 1 à des chromatographies séparatives plus poussées, on a isolé les produits de formule IIa (Ex. 2) et de formule IIIa (Ex. 3) avec une pureté supérieure ou égale à 98 %.

Analyse (entreprise comme indiqué à la préparation C ci-dessus)

### *Spectre RMN de Ex. 2*

10 Le spectre de RMN du produit de formule IIa (Ex. 2) est identique à celui du produit de formule Ia (Ex. 8) aux différences près suivantes :

- absence des signaux CH<sub>3</sub> à 1,31 ppm et CH<sub>2</sub> à 3,20 ppm de la chaîne éthyle ;
  - disparition des signaux à 3,32 et 3,60 ppm du CH<sub>2</sub> en position 5 sur le
- 15 second sucre .

### *Spectre de masse de Ex. 2*

Masse moléculaire : 578,519 (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>)

Pic de masse : 578 ; adduits de Na et K conformes.

### *Spectre RMN de Ex. 3*

20 Le spectre de RMN du produit de formule IIIa (Ex. 3) est identique à celui du produit de formule Ia (Ex. 8) à la différence près suivantes :

- simplification du massif correspondant aux protons de la partie sucre avec un seul proton anomère à 4,76 ppm (d).

### *Spectre de masse de Ex. 3*

25 Masse moléculaire : 446,404 (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>)

Pic de masse : 446 ; adduits de Na et K conformes.

### *Préparation D*

- Obtention du produit de formule Ib (Ex.5) -

30 En reproduisant le procédé des Préparations A et C ci-dessus, à partir de l'écorce ou des racines de *Prunus yedoensis*, on obtient le composé de formule Ib.

### *Préparation E*

- Obtention du 4'-sulfate du produit de formule Ib (Ex.7) -

35 Le produit attendu est obtenu par sulfatation du groupe 4'-OH selon une méthode connue en soi.

### Essais F

La propriété d'améliorer la texture de la peau a été appréciée par le biais de la régénération du tissu cutané après brûlure.

On rase une portion du dos de rats mâles adultes et applique sur cette  
5 portion une platine métallique de 0,5 cm<sup>2</sup> chauffée à une température de 130 °C pour créer une zone de brûlure calibrée. On applique un gel contenant 0 (lot témoin) ou 1,5 % en poids de produit de formule I (lots traités) une fois par jour pendant 21 jours sur la brûlure des rats (8 animaux par produit à tester, 10 animaux pour le lot témoin). On constate que, chez  
10 les lots traités (Ex 1 à Ex 10), la régénération du tissu cutané est obtenue en 1 mois ; en revanche chez le lot témoin, ladite régénération intervient en 6 à 8 semaines

### Essais G

L'étude des propriétés antiradicalaires des produits selon l'invention  
15 (Ex. 1 à Ex. 10) a été entreprise selon le procédé de "*détermination du potentiel de défense antiradicalaire*", objet de la demande de brevet français No. 03 12 351 déposée le 22 octobre 2003, en suivant la cinétique de la lyse d'hématies (notamment des hématies de mouton ; il est également possible d'opérer sur sang total ou plasma sanguin) induite par des radicaux  
20 libres générés *in situ*, en présence d'un produit selon l'invention à des doses croissantes de 0 mg/L (lot témoin) à 100 mg/L (lots traités), et avec hydrolyse du milieu réactionnel au moyen d'un mélange d'enzymes ( $\beta$ -glucosidase, sulfatase et  $\beta$ -glucuronidase). Selon ce procédé, on mesure en particulier le temps ( $T_{1/2}$ ) qui correspond à la lyse de la moitié des cellules  
25 concernées, ici les hématies, en fonction de la concentration (en mg/L) du produit de formule I à tester.

Une partie des résultats obtenus est consignée dans la figure 1 ci-après, dans laquelle la courbe 1 est celle du produit Ex. 1 ; la courbe 2, celle de Ex. 2 ; la courbe 3, celle de Ex. 3 ; et la courbe 4, celle de Ex. 4.

30 La figure 1 montre que Ex. 4 (i. e. le mélange Ia/IIa 80/20 p/p), qui contient le composé Ia (i. e. Ex. 8) "contaminé" par le composé IIa (i. e. Ex. 2), est plus actif en tant que substance antiradicalaire que Ex. 1, Ex. 2 et Ex. 3.

### Essais H



Des essais complémentaires ont été réalisés avec Ex. 10 et ses constituants (Ex. 5, Ex. 2 et Ex. 3) sur des cellules sanguines humaines [fournies par EFS (Etablissements Français du Sang)].

Il s'agit de cellules sanguines isolées sur coussin de Ficoll et conservées sous vapeur d'azote liquide. Après décongélation, lesdites cellules sont incubées pendant 24 h à 37 °C avant l'addition des produits de formule I à tester. Après nouvelle incubation à 37 °C pendant 24 h ou 48 h, les cellules sont analysées pour apprécier l'éventuelle expression de marqueurs membranaires significatifs, selon le tableau II qui suit.

10

*Tableau II*

| Analyses du matériel cellulaire | Expression du marqueur membranaire |
|---------------------------------|------------------------------------|
| Lymphocytes T                   | CD3                                |
| Lymphocytes T cytotoxiques      | CD8                                |
| Lymphocytes T "helper"          | CD4                                |
| Lymphocytes B                   | CD19                               |
| Monocytes/macrophages           | CD11c                              |
| Activations cellulaires         | CD69                               |
| Surnageants cellulaires         | IL-2                               |

Comme indiqué dans le tableau II, les surnageants cellulaires ont été analysés pour leur contenu en interleukine 2 (IL-2), produit induisant la prolifération des lymphocytes T, avec ou sans ajout d'un activateur notamment (i) la phyto-hématoglutinine (PHA), qui est un activateur classique, et (ii) un super antigène (SEB), qui induit une interaction entre les molécules de classe II des lymphocytes B avec les récepteurs des lymphocytes T ou TRC mimant de ce fait une présentation d'antigène

On observe deux points majeurs, à savoir :

- (1) Ex. 10 et ses constituants, Ex. 5, Ex. 2 et Ex. 3, n'induisent pas la prolifération des cellules sanguines de la réponse immunitaire ; et
- (2) Ex. 10, Ex. 5, Ex. 2 et Ex. 3 sont actifs sur ces cellules et vont interférer avec les cascades de signaux entraînant une réponse immunitaire ; l'effet observé semble être immunosuppresseur avec

25

une diminution de production d'anticorps pour les lymphocytes B, une diminution des MHC de classe II pour les cellules dendritiques et une inhibition de la production d'IL-2 (facteur induisant la prolifération lymphocytaire) suite à la stimulation par PHA ou SEB.

Les figures 2 et 3 montrent l'effet des produits Ex. 10, Ex. 5, Ex. 2 et Ex. 3 sur la sécrétion de IL-2 induite par PHA (figure 2) et, respectivement, par SEB (figure 3). En particulier la figure 3, d'une part, présente la production (exprimée en pg/mL) de IL-2 par rapport à la concentration (exprimée en pmol/mL) en SEB (courbe 11), SEB + Ex. 10 (courbe 12), SEB + Ex. 5 (courbe 13), SEB + Ex. 2 (courbe 14) et SEB + Ex. 3 (courbe 15) et, d'autre part, montre l'effet des produits Ex.10, Ex. 5, Ex. 2 et Ex. 3 sur la stimulation des cellules immunitaires.

En conclusion, les composés de formule IV, et notamment les produits des exemples 1, 4, 8, 9 et 10 sont particulièrement intéressants eu égard à :

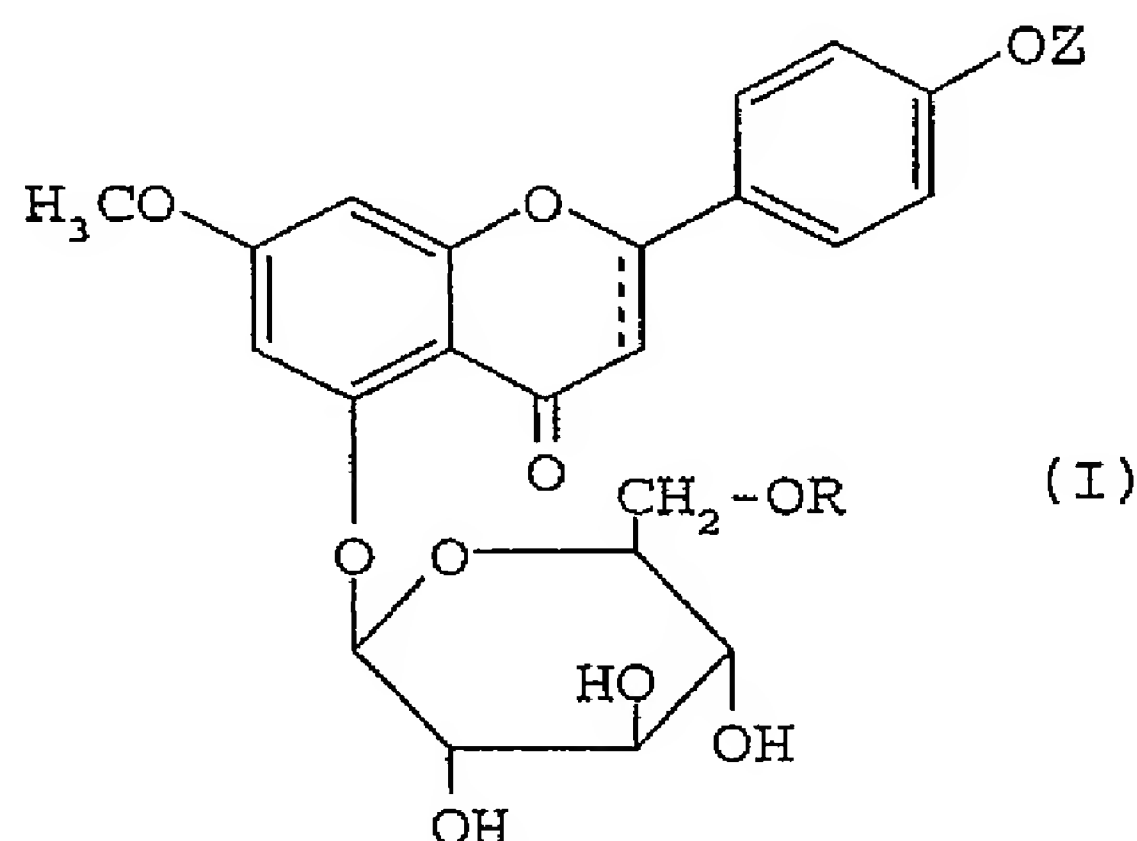
- leurs effets immunomodulateurs, notamment vis-à-vis de poussées récentes de sclérose en plaque ;
- leurs effets immunosuppresseurs, notamment illustrés par inhibition de l'activité des stimulants PHA et SEB sur la production de IL-2 ;
- leurs effets anti-blastiques (i.e. par destruction des leucoblastes) et qui sont utiles dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique et des leucémies aiguës ;
- leurs effets contre certains cancers; et
- la quasi-absence d'effets secondaires néfastes quand ils sont administrés par voie topique, orale ou injectable.

Chez l'homme adulte, la posologie recommandée pour les produits de formule I, et de préférence les produits de formule IV, est de l'ordre de 50 mg/kg *per os*. Ces produits peuvent également être administrés par voie locale sous forme de gels, pommades; onguents ou lotions ; dans cette éventualité, la forme locale peut contenir de 1 à 5 % en poids de produit de formule I, de formule IV ou d'un de leurs mélanges par rapport au poids de ladite forme locale.

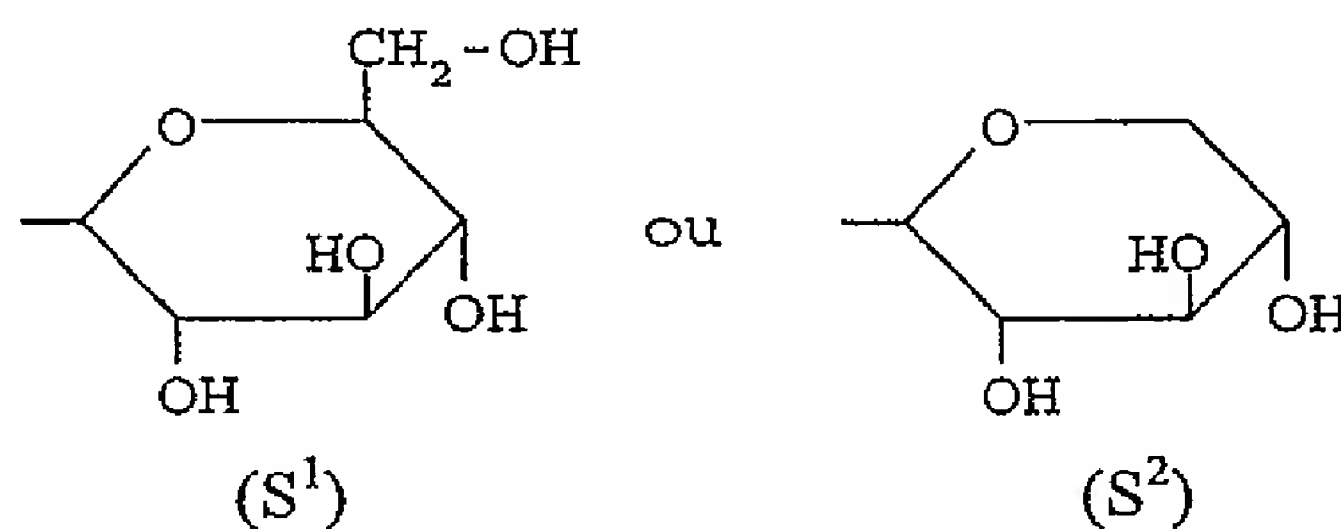
## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un dérivé de genkwanine ou de sakuranétine, ladite utilisation étant caractérisée en ce que l'on fait appel à une substance choisie parmi l'ensemble constitué par

(i) les dérivés osylés de genkwanine ou sakuranétine de formule I :



dans laquelle,  
le symbole  $\equiv$  représente une simple ou une double liaison,  
R représente H ou un reste osyle, notamment de structure  $S^1$  ou  $S^2$  :



Z représente H, un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, acyle en C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, ose ou sulfate, et

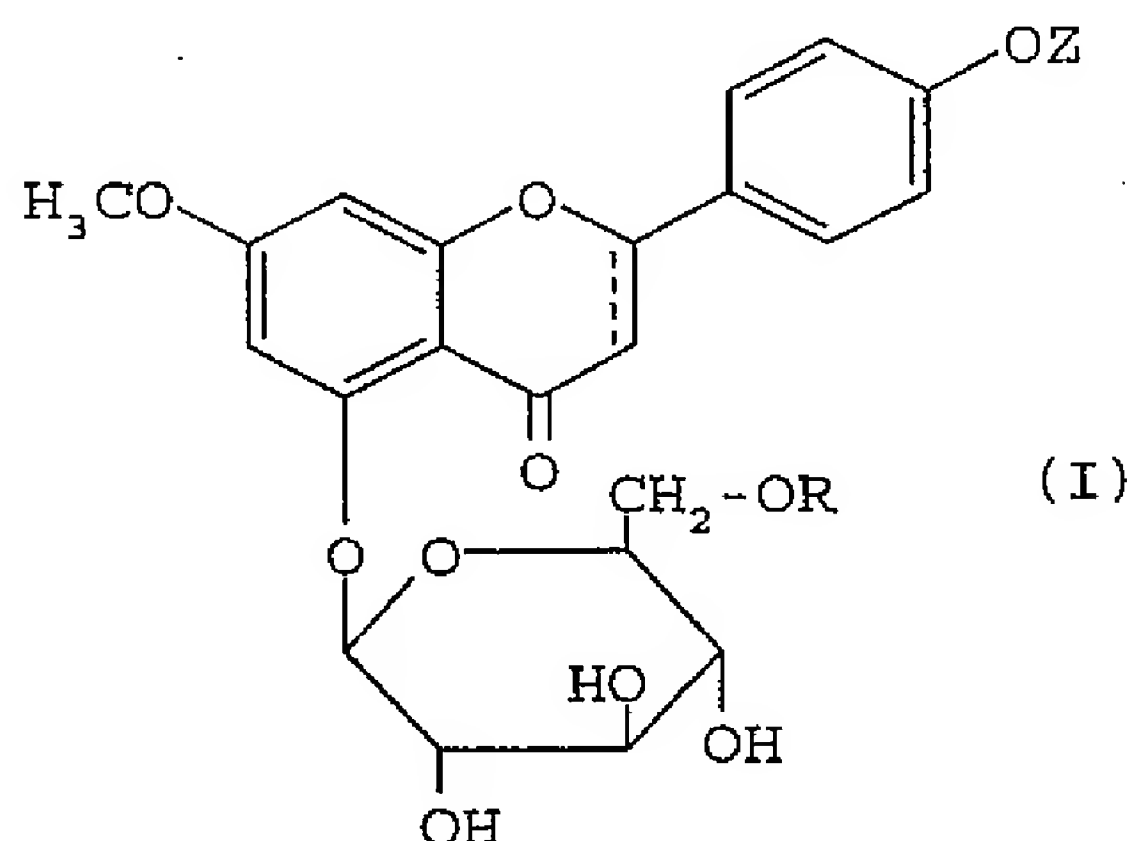
(ii) leurs mélanges,

en tant qu'ingrédient actif cosmétique ou dermatologique pour l'obtention d'une préparation cosmétique ou dermatologique pour améliorer la texture de la peau.

2. Utilisation d'un dérivé de genkwanine ou de sakuranétine, ladite utilisation étant caractérisée en ce que l'on fait appel à une substance choisie parmi l'ensemble constitué par

(i) les dérivés osylés de genkwanine ou sakuranétine de formule I :

5

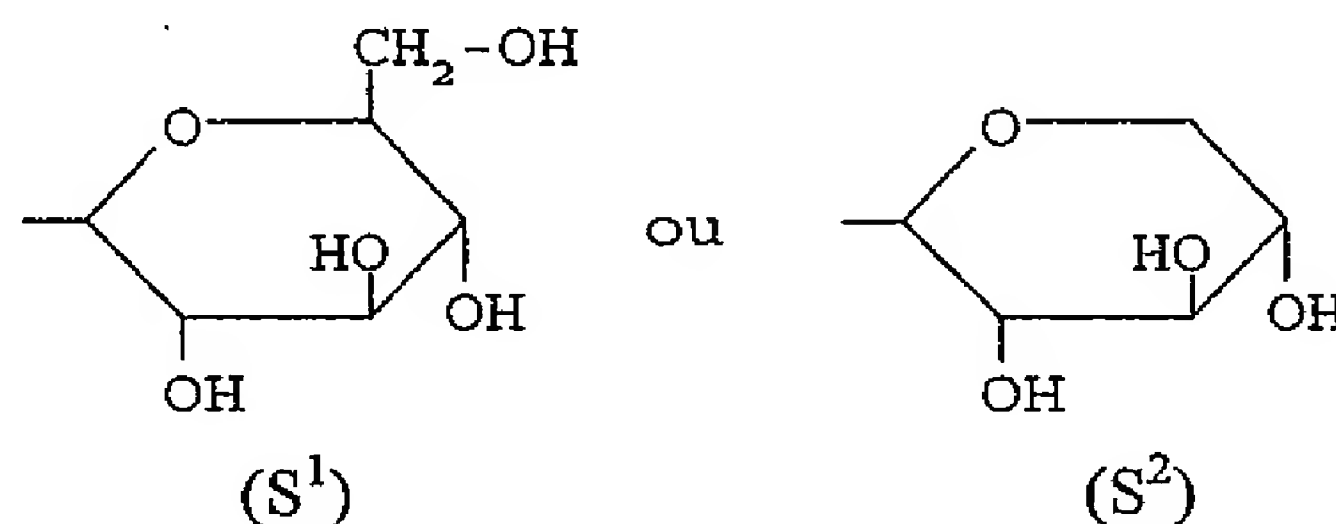


dans laquelle,

le symbole  $\equiv$  représente une simple ou une double liaison,

R représente H ou un reste osyle, notamment de structure  $S^1$  ou  $S^2$  :

10



15

Z représente H, un groupe alkyle en  $C_1-C_4$ , acyle en  $C_1-C_5$ , ose ou sulfate, et

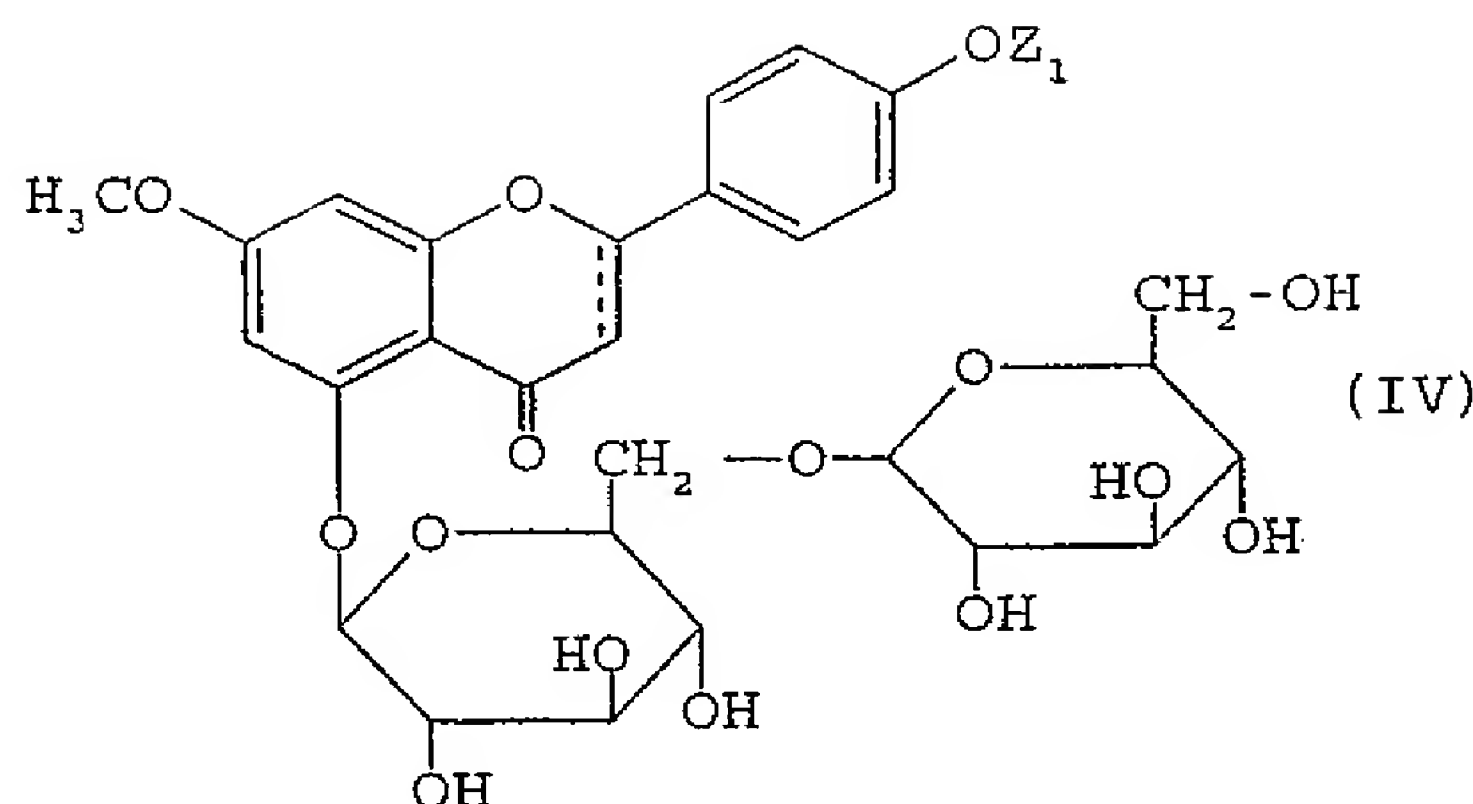
(ii) leurs mélanges,

en tant qu'ingrédient actif antiradicalaire pour l'obtention d'un médicament destiné à un usage en thérapeutique vis-à-vis des désordres provoqués par les radicaux libres.

20

3. Utilisation suivant la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite substance est choisie parmi l'ensemble constitué par

- les composés de formule IV :

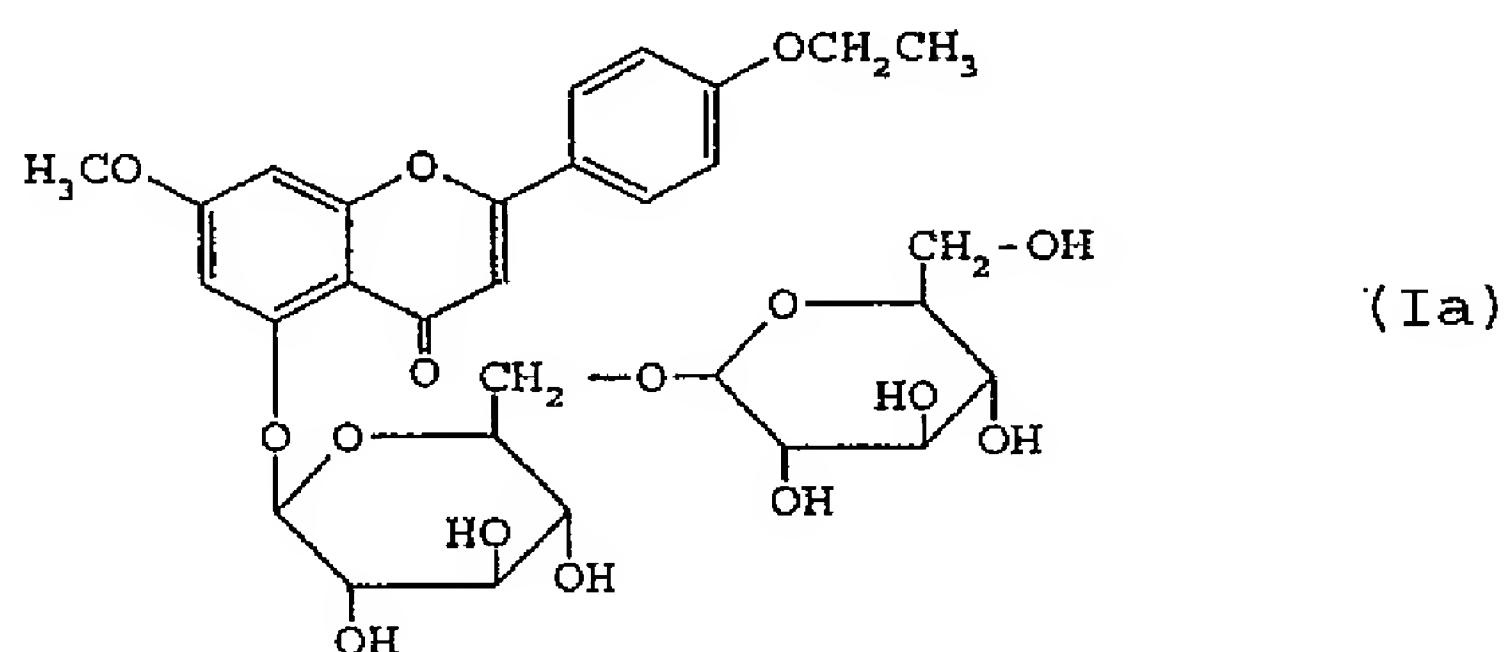


dans laquelle symbole  $\equiv$  représente une simple ou une double liaison et  $Z_1$  représente H, un groupe alkyle en  $C_1-C_4$ , acyle en  $C_1-C_5$ , ose ou sulfate et est avantageusement un groupe alkyle en  $C_1-C_4$  (de préférence le groupe éthyle) ou sulfate (de préférence le groupe  $SO_3H$ ), et

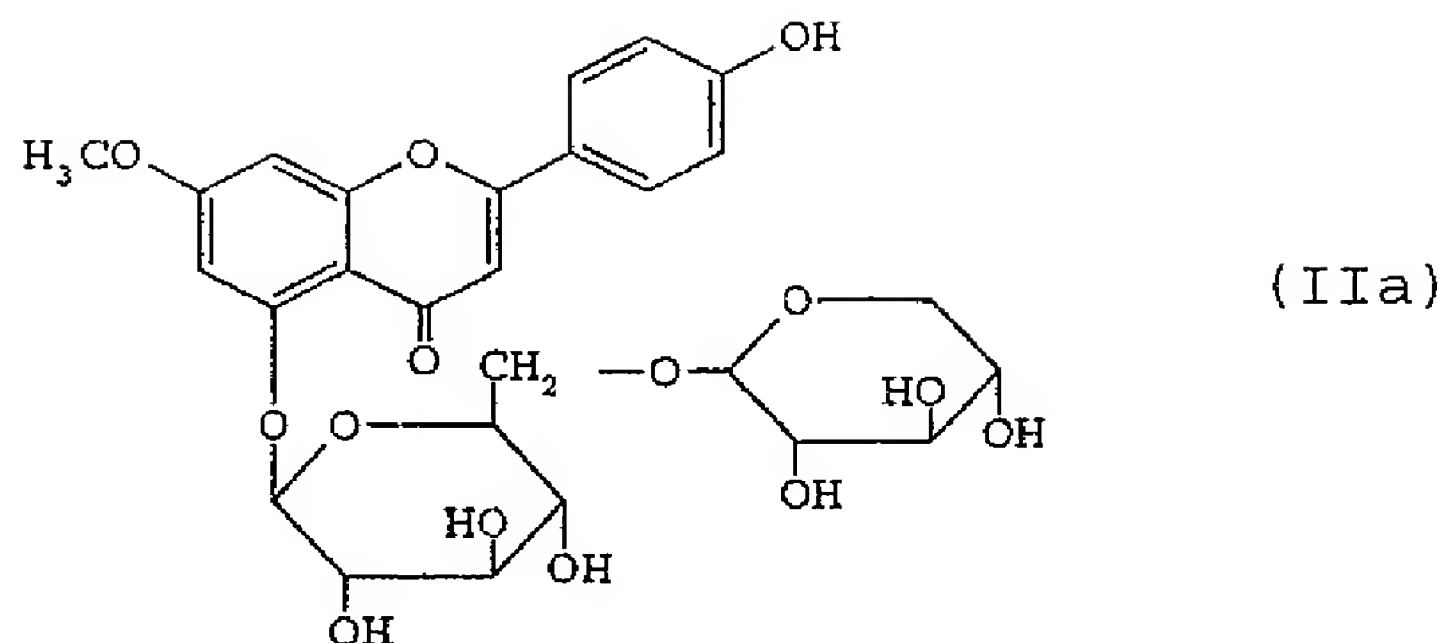
- leurs mélanges.

4. Utilisation suivant la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite substance est choisie parmi l'ensemble constitué par :

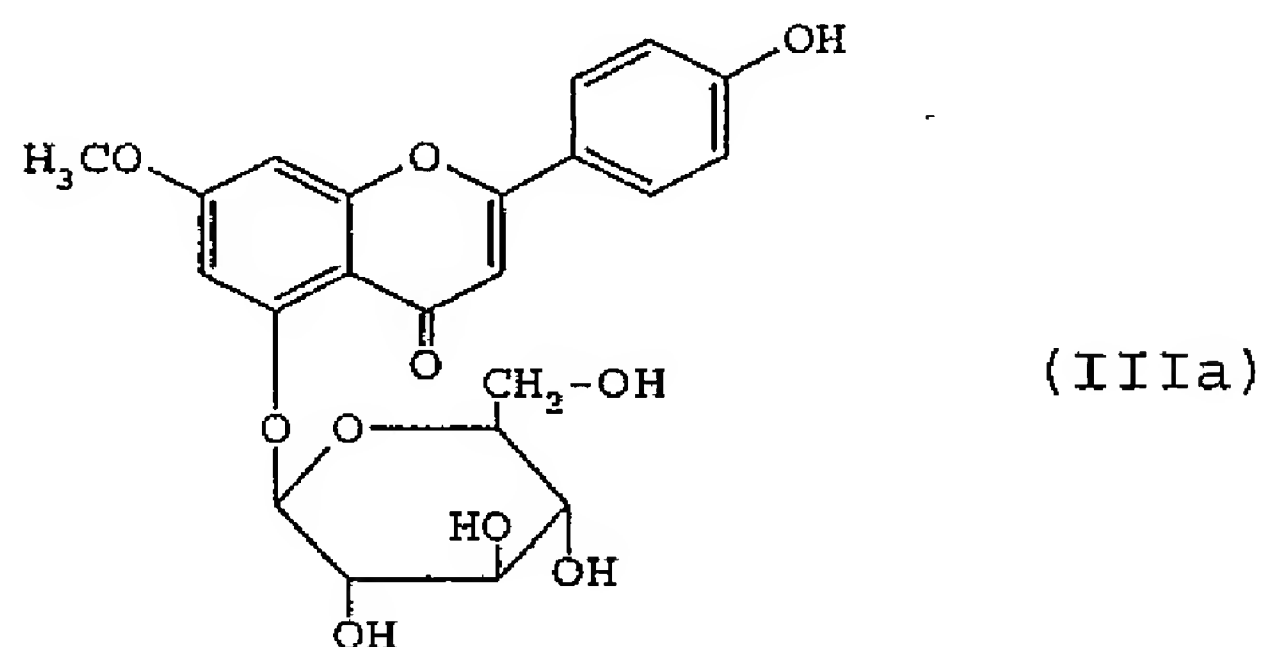
- la 5-[O-6-(D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]oxy-2-(4-éthoxyphényl)-7-méthoxy-4H-1-benzopyran-4-one de formule Ia :



- la 5-O- $\beta$ -D-primevérosyl-genkwanine de formule IIa :



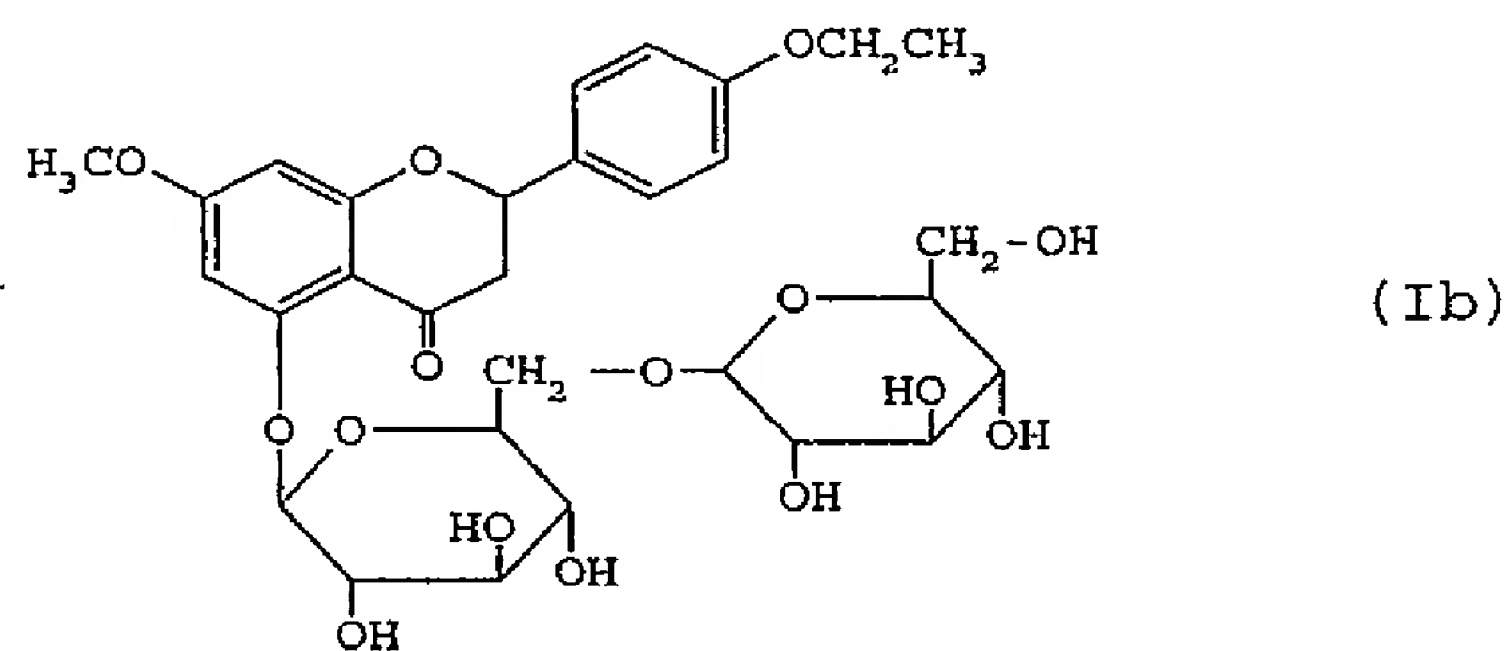
- le pinostrobin-5-glucoside de formule IIIa :



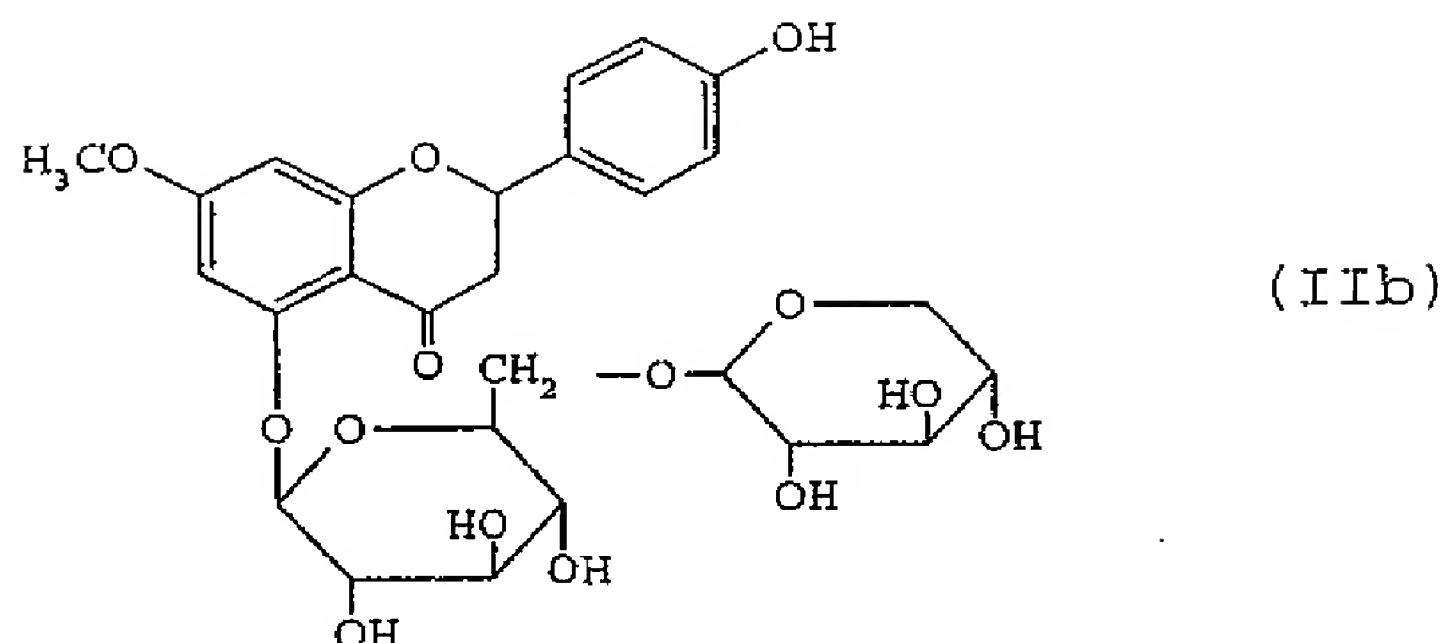
5

- la 2,3-dihydro-5-[O-6-(D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]oxy-2-(4-éthoxyphényl)-7-méthoxy-4H-1-benzopyran-4-one de formule Ib :

10

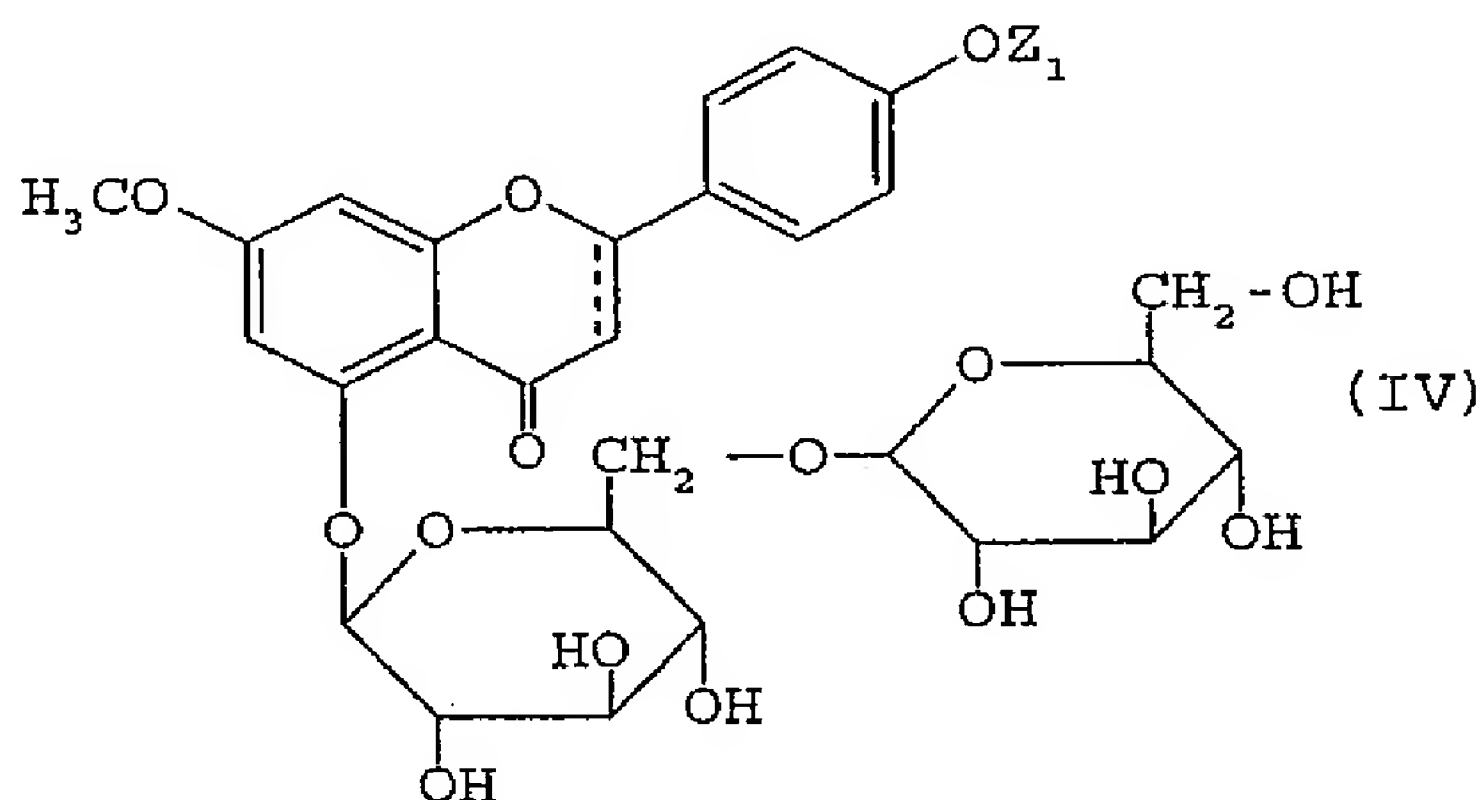


- la 5-O- $\beta$ -D-primevérosyl-sakuranétine de formule IIb :



- leurs dérivés où Z est un groupe sulfate (de préférence  $\text{SO}_3\text{H}$ , ou le cas échéant  $\text{SO}_3\text{Na}$  voire  $\text{SO}_3\text{NH}_4$ ), et
  - leurs mélanges.
5. Dérivé osylé de genkwanine ou de sakuranétine, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'ensemble constitué par
- les composés répondant à la formule générale IV :

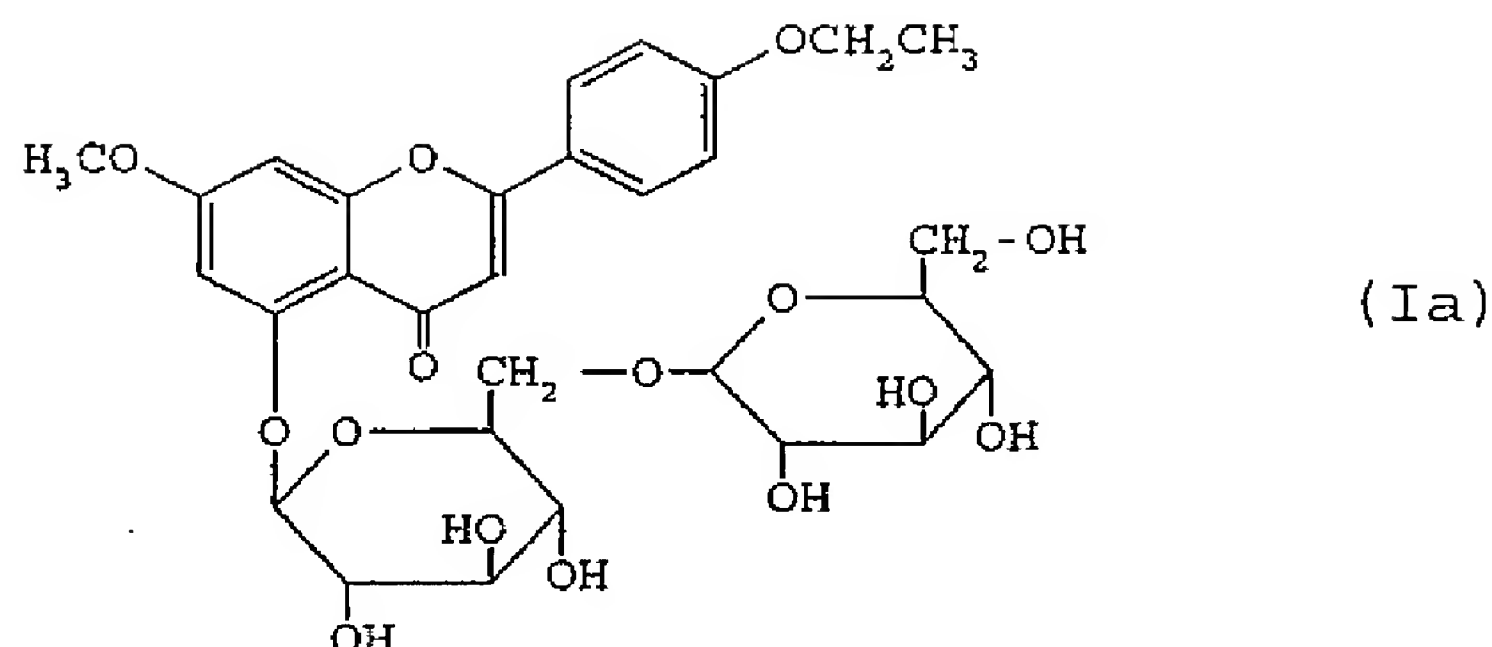
10



dans laquelle symbole  $\equiv$  représente une simple ou une double liaison et  $Z_1$  représente H, un groupe alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$ , acyle en  $\text{C}_1\text{-C}_5$ , ose ou sulfate et est avantageusement un groupe alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_4$  (de préférence le groupe éthyle) ou sulfate (de préférence le groupe  $\text{SO}_3\text{H}$ ); et,

- leurs mélanges.
6. Dérivé osylé de genkwanine suivant la revendication 5, caractérisé en ce que ledit est un composé répondant à la formule Ia :





7. Procédé pour la préparation d'un composé de formule I selon la revendication 1 ou 2, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend  
5 les étapes suivantes :

- (i) on extrait la genkwanine, la sakuranétine ou un de leurs osides à partir d'une plante appropriée appartenant à l'ensemble des *Prunus*, *Gnidia* et *Daphne* ;
- (ii) on osyle en position 5 l'aglycone avec un ose approprié (si nécessaire après blocage de la fonction OH en position 4' si celle-ci n'est pas protégée) ;  
10 et/ou
- (iii) on étherifie (notamment au moyen d'un iodure d'alkyle pour ne pas affecter les groupes OH de la portion sucre), estérifie ou sulfate le groupe 4'-OH de l'oside extrait ou préparé comme indiqué ci-dessus (si nécessaire  
15 après déprotection du groupe 4'-OH).

8. Procédé suivant la revendication 7, pour la préparation du composé de formule Ia selon la revendication 4 ou 6, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- (1°) extraire les racines broyées de *Daphne gnidium* avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,
- 20 (2°) filtrer pour écarter la solution de chlorure de méthylène, ainsi obtenue, et recueillir le résidu solide que l'on sèche ;
- (3°) extraire ledit résidu solide sec, ainsi obtenu, avec CH<sub>3</sub>OH ;
- (4°) filtrer pour recueillir la solution méthanolique, ainsi obtenue, et écarter le résidu solide résultant ;
- 25 (5°) évaporer à sec la solution méthanolique, ainsi recueillie, sous vide, à une température inférieure ou égale à 60 °C, pour obtenir un résidu solide ;

- (6°) laver le résidu solide, ainsi obtenu à l'étape (5°), avec de l'eau à une température inférieure ou égale à 60 °C sous agitation, et laisser refroidir ;
- (7°) éliminer l'eau de lavage puis reprendre le résidu solide avec CH<sub>3</sub>OH ;
- (8°) reproduire 3 à 7 fois le cycle des opérations des étapes (5°) à (7°) jusqu'à ce que la dernière eau de lavage soit jaune pâle et limpide ;
- (9°) reprendre le résidu sec résultant avec un mélange méthanol-eau 25/2 p/p selon une quantité appropriée pour obtenir un liquide ayant une densité de 0,885 g/mL ;
- (10°) laisser reposer ledit liquide à 2-4 °C, de préférence à 3 °C, pendant au moins 2 jours, de préférence pendant 3 jours, et recueillir le précipité formé ;
- (11°) laver ledit précipité avec successivement du méthanol puis des mélanges méthanol-éther ayant des teneurs croissantes en éther, jusqu'à ce que le surnageant soit incolore ;
- (12°) filtrer le précipité, ainsi obtenu, et le laver plusieurs fois à l'éther, jusqu'à ce que l'éther de lavage soit incolore ;
- (13°) filtrer et sécher le produit solide résultant qui est constitué d'un mélange des produits de formules Ia, IIa et IIIa ; et,
- (14°) si nécessaire, séparer ledit mélange pour recueillir le produit de formule Ia.

9. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que l'extraction de l'étape (1°) est menée à une température de 30-35 °C sous pression atmosphérique ou, le cas échéant, à une température plus élevée sous pression réduite, pendant 3-6 jours, dans un appareil de type Kumagawa ; et en ce que l'extraction de l'étape (3°) est effectuée à une température de 45-55 °C, sous pression normale ou, le cas échéant, à une température plus élevée sous pression réduite, dans le même dit appareil, pendant 3-6 jours.

10. Composition cosmétique (a), dermatopharmaceutique (b) ou thérapeutique (c), caractérisée en ce que :

- (a) la composition cosmétique renferme, en association avec un excipient physiologiquement acceptable par voie topique, au moins un composé de formule I ;

- (b) la composition dermatopharmaceutique renferme, en association avec un excipient physiologiquement acceptable notamment par voie topique, au moins un composé de formule I ; ou,
- 5 (c) la composition thérapeutique renferme, en association avec un excipient physiologiquement acceptable notamment par voie orale ou injectable, au moins un composé de formule IV en tant qu'ingrédient actif immunomodulateur, notamment vis-à-vis de poussées récentes de sclérose en plaque, ou anticancéreux, notamment vis-à-vis de la leucémie myéloïde chronique.

1/2

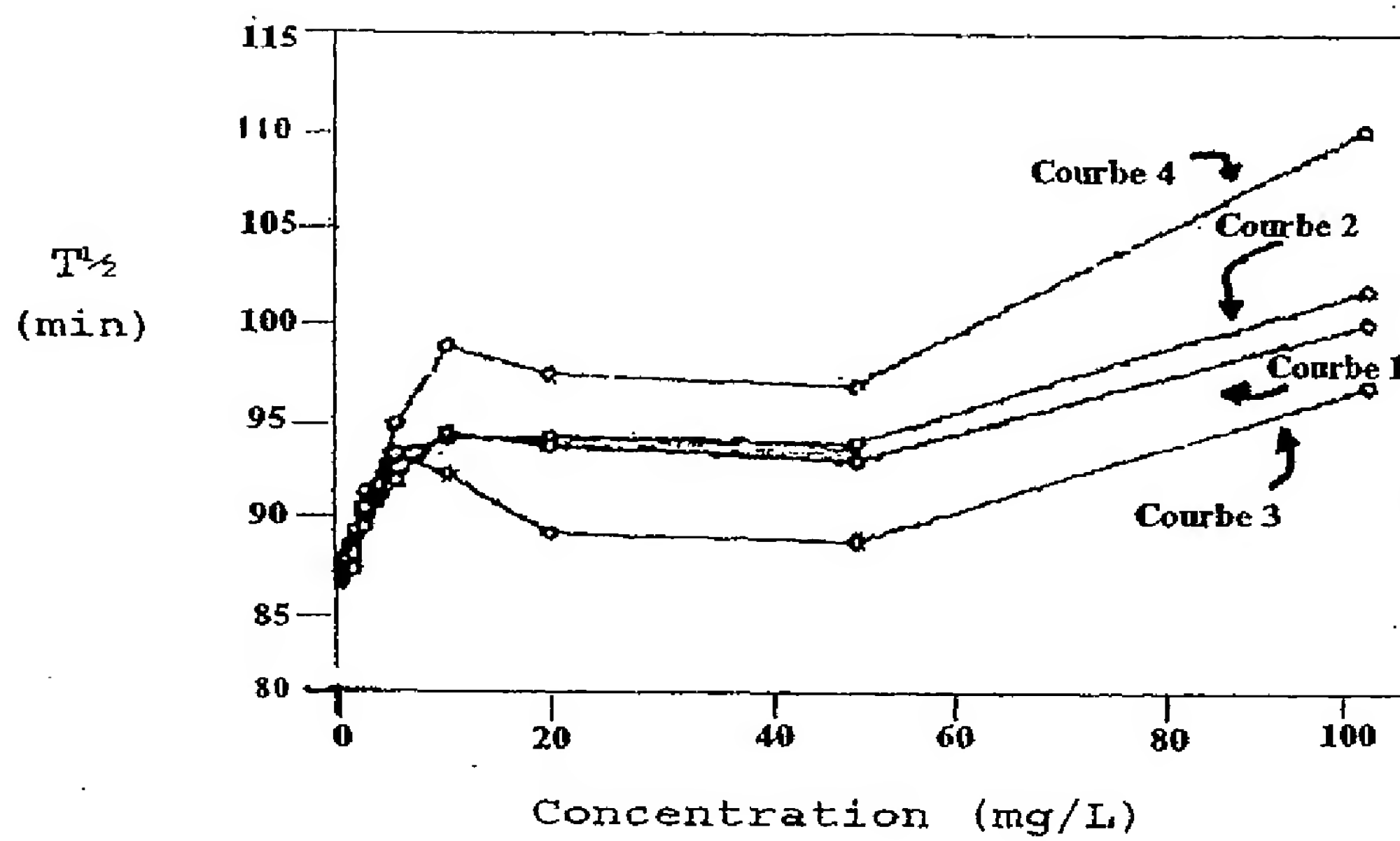


Fig 1

2/2

Fig. 2

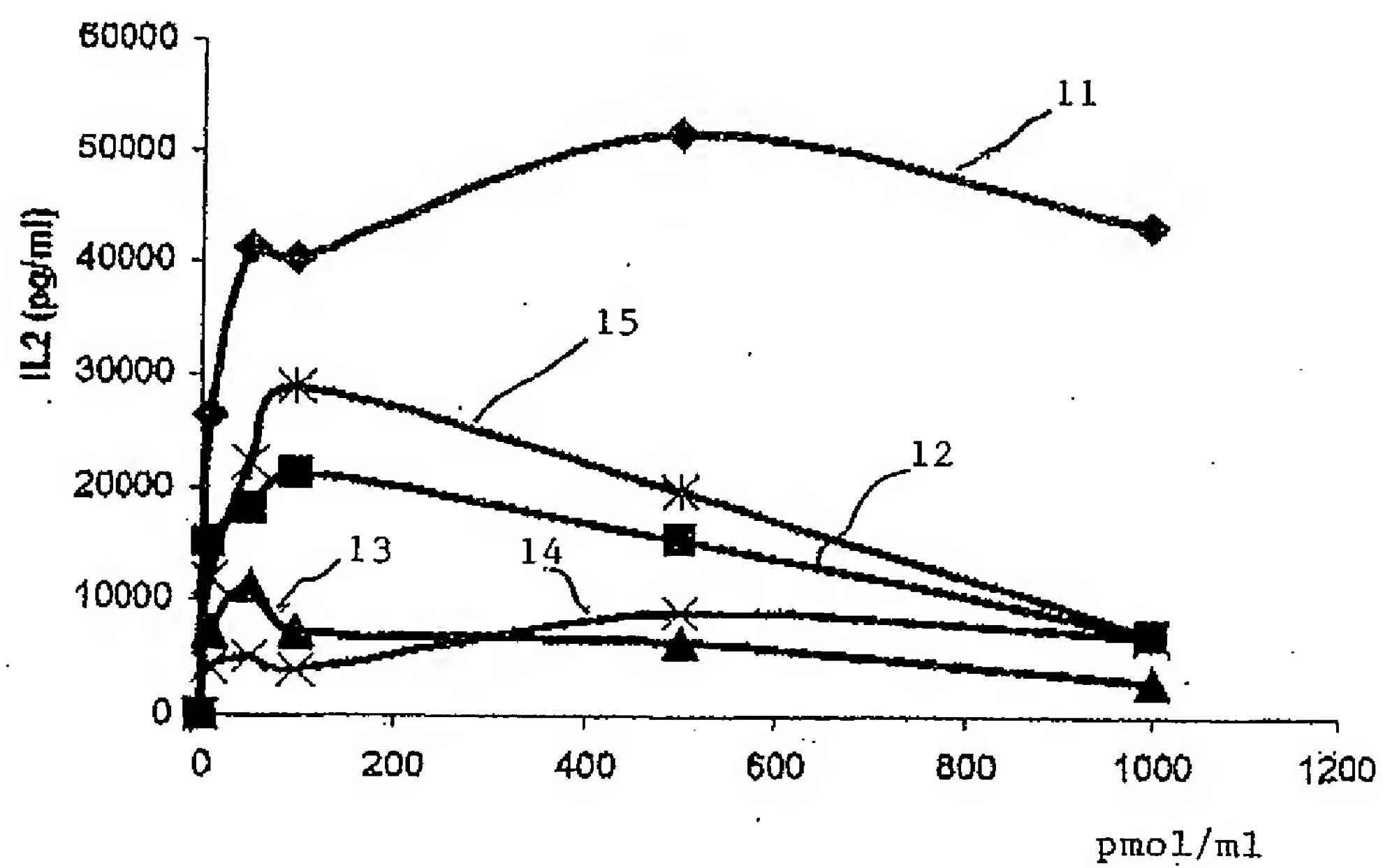
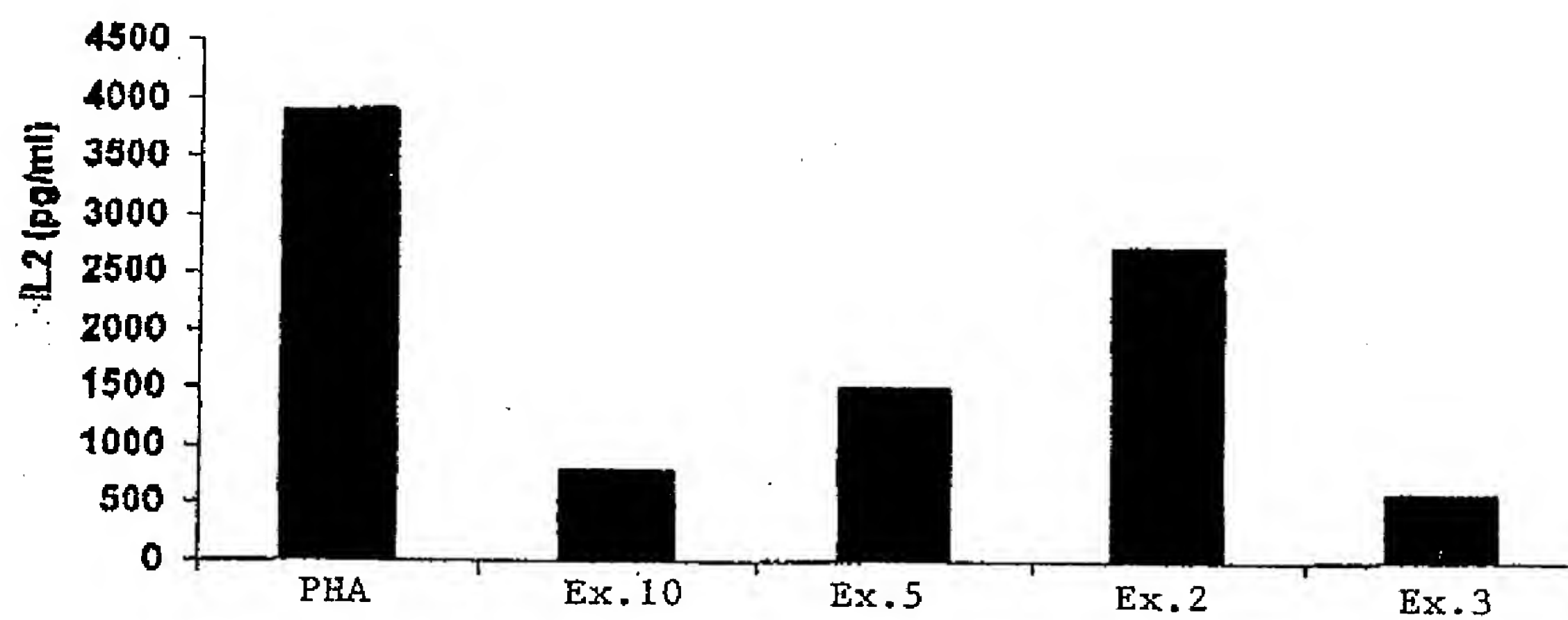


Fig. 3